

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE UNA VACUNA ANTI-GNRH COMO  
MÉTODO INMUNO CONTRACEPTIVO EN HEMBRAS FELINAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias

Autor: MVZ. Washington Fernando Carrasco Sangache

Director: MV, Dra. Cs Vet, María Alejandra Stornelli

Codirector: MV, Dra. Cs Vet, María Carla García Mitacek

Lugar de Trabajo: Laboratorio y Servicio de Reproducción Animal,  
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad  
Nacional de La Plata

Miembros del Jurado: MV, Dra. Cs Vet, Patricia Koscinczuk

MV, Dr. Cs Vet, Fabiana Ferreira

MV, Dr. Cs Vet, Lais L Pardini

La Plata, Buenos Aires, 12 diciembre 2022

*A mis padres Washington y Flor por todo su amor, apoyo y por ser mi  
inspiración.*

*A mis hermanos, Verónica, Cristian y Josué por todo su cariño y por  
siempre estar presentes.*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a mi directora de Tesis la Dra. Alejandra Stornelli por haberme recibido y brindarme su apoyo para la realización de este trabajo, por sus sugerencias y correcciones, por motivarme y guiarme durante todo este tiempo y por compartirme su valioso conocimiento y experiencia.

A mi codirectora de tesis la Dra. María Carla García Mitacek por guiarme y brindarme su conocimiento. Por alentarme a mejorar cada día y por enseñarme lo maravilloso de la investigación. Por todo su aprecio y el tiempo dedicado para la realización de este trabajo y sobre todo muchas gracias por la ayuda y paciencia.

Agradezco a la Dra, Cecilia Stornelli por toda su ayuda y colaboración para que este trabajo pueda realizarse.

Mi agradecimiento especial al Dr. Luzbel de la Sota por haberme recibido y brindarme su apoyo para realizar este trabajo.

A Flor García, Romina Nuñez Favre, Florencia Coralli y Romina Praderio por toda su ayuda, colaboración y consejos para la realización de este trabajo.

A todos los integrantes de la cátedra de reproducción animal por su apoyo para la realización de este trabajo.

A mis padres Washington y Flor por todo su amor y motivación para mejorar cada día. Por ser mi inspiración y un ejemplo que seguir.

A mis hermanos Verónica, Cristian y Josué por todo su apoyo, compañía y por motivarme a mejorar cada día.

A Jagger Segura por toda su ayuda, compañía y apoyo para la realización de este trabajo.

A Katherinne Diaz por su compañía y apoyo.

A la Universidad Nacional de La Plata por haberme permitido realizar este trabajo.

A la Universidad Estatal de Bolívar por el financiamiento para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Patricia Koscinczuk, Dra. Fabiana Ferreira y Dra. Lais Pardini por sus valiosas sugerencias y correcciones.

A Vitalcan por proporcionar el alimento para las gatas.

## ÍNDICE

LISTA DE PUBLICACIONES .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XIII
LISTA DE TABLAS .....	XVI
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY .....	XIX
 CÁPITULOS	
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
Introducción .....	1
Control poblacional .....	2
Ciclo estral de la gata: estadios, endocrinología y citología vaginal .....	3
Métodos anticonceptivos.....	7
Progestágenos.....	8
Andrógenos .....	11
Melatonina.....	11
Análogos de la GnRH .....	12
Inmunocostracepción .....	14
Objetivo General .....	16
Objetivos Específicos.....	16

## II. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE DOS DOSIS DE LA VACUNA ANTI-GNRH COMO MÉTODO INMUNO CONTRACEPTIVO EN GATAS

Introducción .....	17
Materiales y métodos .....	25
Análisis estadístico .....	30
Marco bioético .....	30
Resultados .....	32
Discusión y conclusiones .....	43
Conclusión.....	46

## III. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE DOS DOSIS DE LA VACUNA ANTI-GNRH SOBRE LA MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DEL ÚTERO Y OVARIO

Introducción .....	47
Materiales y métodos .....	54
Análisis estadístico.....	59
Marco bioético .....	60
Resultados .....	60
Discusión y conclusiones .....	72
Conclusiones .....	74

CONCLUSIONES GENERALES .....	75
BIBLIOGRAFÍA .....	77
BIOGRAFIA PERSONAL .....	97

## LISTA DE PUBLICACIONES

### TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS PERIÓDICAS CON REFERATO

1. Métodos contraceptivos en gatas: pasado, presente y futuro. *Analecta Veterinaria*. Washington Fernando Carrasco Sangache; María Carla García Mitacek; María Alejandra Stornelli. Agosto 2022. e-ISSN: 1514-2590. ISSN: 0365-5148. doi: 10.24215/15142590e065

### TRABAJOS PUBLICADOS EN CONGRESOS

1. Evaluación de parámetros hematológicos durante el ciclo estral en gatas como animales de laboratorio. Carrasco Sangache, W.F; García Mitacek, M.C; Stornelli, M.C; García, M.F; Coralli, F.L; Stornelli, M.A. II Reunión Científica Internacional, Vil Reunión Científica Regional y VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio. Modalidad virtual 27, 28 y 29 de octubre de 2021.
2. Evaluación de parámetros hematológicos en gatas (*Felis catus*) tratadas con una vacuna anti-hormona liberadora de gonadotropina. Resultados preliminares. Carrasco Sangache WF; García Mitacek MC; Stornelli MC; Nuñez Favre R; Segura Ochoa JJ; Tebés M; Stornelli MA. XXI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. 9, 10, 11 de diciembre de 2021
3. Evaluación de la eficacia de una vacuna anti-GnRH sobre la producción espermática en felinos domésticos. Segura Ochoa, Jorge; García, María

Florencia; Tebes Micaela; Nuñez Favre, Romina; Washington Carrasco Sangache; Stornelli, María Cecilia; Stornelli, María Alejandra. XXI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. 9, 10, 11 de diciembre de 2021.

4. Evaluación de cambios ultrasonográficos uterinos en gatas tratadas con la vacuna anti-GnRH Improvac<sup>®</sup> (Zoetis). Resultados preliminares. García Mitacek MC; Carrasco Sangache WF; Stornelli MC; García MF; Coralli FL; Praderio RG; Stornelli MA. XXI Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. 9, 10, 11 de diciembre de 2021.
5. Efecto de una vacuna anti-GnRH sobre la concentración de estrógenos y progesterona en gatas. Carrasco Sangache WF; García Mitacek MC; Stornelli MC; García MF; Coralli FL; Nuñez Favre R; Stornelli MA. XI Jornadas de jóvenes investigadores. Buenos aires – Argentina. 9 y 10 de junio de 2022.
6. Effect of GnRH vaccine in Queens. Carrasco Sangache WF; García Mitacek MC; Stornelli MC; García F; Coralli F; de la Sota RL; Stornelli MA. ISCFR-EVSSAR 2020+2. Milán, Italia. 30 de junio al 2 de Julio de 2022

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACG	Altura celular glandular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Atrofia del endometrio
ALB	Albumina
ALT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de varianza
AST	Aspartato aminotransferasa
BAN	Neutrófilos en banda
BAS	Basófilos
CC	Condición corporal
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CON	Control
CRE	Creatinina
DCU	Diámetro del cuerpo uterino
DGE	Diámetro glandular externo
DGI	Diámetro glandular interno
dL	Decilitro
DMAXF	Diámetro máximo del folículo
DMAXO	Diámetro máximo del ovocito
DMF	Diámetro medio folicular
DMINO	Diámetro mínimo del ovocito
DMINO	Diámetro mínimo del folículo

DMO	Diámetro medio del ovocito
E <sub>2</sub>	Estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EN	Endometrio normal
EOS	Eosinófilos
ERI	Eritrocitos
FP	Folículos primordiales
FPM	Folículos primarios multilaminares
FPU	Folículos primarios unilaminares
FR	Frecuencia respiratoria
FS	Folículos secundarios
FSH	Hormona folículo estimulante
g	Gramo
GE	Grosor endometrial
GLOB	Globulinas
GLU	Glucosa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HB	Hemoglobina
HE	Hiperplasia del endometrio
HTO	Hematocrito
Kg	Kilogramo
L	Litro
LEU	Leucocitos
LIN	Linfocitos

mg	Miligramos
MHz	Megahercio
mL	Mililitro
MON	Monocitos
NEU	Neutrófilos
ng	Nanogramo
OVH	Ovariohisterectomía
P <sub>4</sub>	Progesterona
PF	Puso femoral
pg	picogramo
ppm	Pulsos por minuto
PT	Proteínas totales
Sc	Subcutáneo
ST	Sólidos totales
TE	Temperatura corporal
TRT	Tratamiento
UI	Unidades internacionales

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
2.1. Diseño experimental para el estudio del efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac <sup>®</sup> (TRT) o solución salina (CON) en gatas	26
2.2. Cuadrados mínimos $\pm$ error estándar del pulso femoral y frecuencia respiratoria entre las gatas CON y TRT desde el D0 al D90.....	34
2.3. Cuadrados medios mínimos de los parámetros hematológicos y de la concentración de ST en los grupos CON y TRT desde el D0 al D90 ....	37
2.4. Cuadrados medios mínimos del conteo diferencial de leucocitos en los grupos CON y TRT desde el D0 al D90.....	38
2.5. Cuadrados medios mínimos de las concentraciones de PT, ALB, GLOB, ALT, AST, UREA y CRE en los grupos CON y TRT desde el D0 al D90.....	40
2.6. Concentración de P <sub>4</sub> en las gatas del grupo CON y TRT desde el D0 al D90 .....	41
2.7. Cuadrados mínimos $\pm$ error estándar del DCU (cm) entre las gatas del grupo CON y TRT desde el D0 al D90 .....	42
2.8. Cuadrados medios mínimos $\pm$ error estándar del diámetro del cuerpo uterino (cm) de las gatas TRT desde el día 0 al día 345.....	43

3.1. Corte histológico de un ovario de gata teñido con hematoxilina y eosina, visto a 40X en donde se observa la médula y corteza ovárica conteniendo folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo.....	48
3.2. Folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo. FP: folículo primordial, FPU: folículo primario unilaminar, FPM: folículo primario multilaminar, FS: folículo secundario, FT: folículo terciario.....	49
3.3. Corte histológico transversal del útero de una gata teñido con hematoxilina y eosina a 40X y 600X.....	52
3.4. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac® (TRT) o solución salina (CON) en gatas sobre la morfometría uterina .....	57
3.5. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac® (TRT) o solución salina (CON) en gatas sobre la morfometría ovárica.....	59
3.6. Cortes transversales de úteros teñidos con hematoxilina y eosina a 40X .....	61
3.7. Grosor endometrial ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según el día de la ovariectomía .....	62
3.8. Grosor endometrial ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según las características histológicas del endometrio .....	62

3.9. ACG ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según el día de la ovariectomía. ....	63
3.10. Altura celular glandular ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según las características histológicas del endometrio. ....	64
3.11. DGI y DGE ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según el día de la ovariectomía.. ....	65
3.12. Cuadrados medios mínimos $\pm$ error estándar del diámetro interno y externo de las glándulas endometriales ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según las características histológicas del endometrio.....	66
3.13. Cortes histológicos de ovarios de gatas teñidos con hematoxilina y eosina a 40X. ....	67
3.14. Cuadrados medios mínimos $\pm$ error estándar del diámetro medio de los ovocitos y folículos ( $\mu\text{m}$ ) en los grupos CON y TRT. ....	68
3.15. Cuadrados medios mínimos $\pm$ error estándar del diámetro medio de los ovocitos y folículos ( $\mu\text{m}$ ) en los grupos CON y TRT según el día de la ovariectomía. ....	69
3.16. Cuadrados medios mínimos $\pm$ error estándar del diámetro de los ovocitos y folículos en las diferentes etapas de desarrollo folicular. ....	71

## LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1.1. Eficacia y efectos colaterales relacionados con la utilización de progestágenos en gatas .....	10
2.1. Cuadrados mínimos $\pm$ error estándar de los parámetros clínicos (TE, PF, FR, CC) entre el grupo CON y TRT.....	33
2.2. Cuadrados mínimos $\pm$ error estándar de la condición corporal (CC) entre las gatas CON y TRT desde el D0 al D90.....	34
2.3. Cuadrados mínimos $\pm$ error estándar de los parámetros hematológicos entre el grupo CON y TRT desde el D0 al D90 .....	36
2.4. Cuadrados mínimos $\pm$ error estándar de los parámetros bioquímicos entre el grupo CON y TRT desde el D0 al D90 .....	39

## RESUMEN

### EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE UNA VACUNA ANTI-GNRH COMO MÉTODO INMUNO CONTRACEPTIVO EN HEMBRAS FELINAS

Se evaluó el efecto de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre la ocurrencia del ciclo estral en gatas y su efecto sobre los parámetros clínicos, hematológicos, bioquímicos, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, el diámetro uterino y sobre la morfometría ovárica y uterina. Se utilizaron (n=12) gatas pertenecientes a la colonia de experimentación de la cátedra de reproducción animal, de la FCV de la UNLP. Las gatas fueron sometidas a un régimen de luz artificial (14h luz, 10h oscuridad), se determinó el ciclo estral mediante citología vaginal cada 48 horas. En el grupo 1 (CON, n= 3) las gatas recibieron 0,5 mL de solución fisiológica por vía subcutánea en la parrilla costal izquierda el D1 (interestro) y el D30. En el grupo 2 (TRT, n= 9) las gatas recibieron 0,5 mL de la vacuna Improvac<sup>®</sup> por vía subcutánea en la parrilla costal izquierda el D1 y D30. Se tomaron muestras sanguíneas para hematología, bioquímica, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> cada 15 días. Las gatas CON fueron castradas el D90, las gatas TRT fueron castradas el D120, D270 y D330. Los datos fueron analizados mediante GLIMMIX de SAS<sup>®</sup> 9.4. Todas las gatas CON continuaron ciclando. En el grupo TRT dos (n=2/9) gatas presentaron un estro posvacunal (D10 y D45) y posteriormente no volvieron a ciclar hasta el día en el fueron castradas (D270 y D120 respectivamente). Siete (n=7/9) gatas TRT no presentaron estro luego de la vacunación hasta el día en el que fueron castradas (D120-D330). Los parámetros clínicos, hematológicos y bioquímicos se mantuvieron normales en los grupos CON y TRT. Las concentraciones de P<sub>4</sub> se mantuvieron basales durante todo el

estudio en los grupos CON y TRT. En el grupo TRT hubo una disminución del diámetro del cuerpo uterino. Histológicamente las gatas CON presentaron ovarios y endometrio normal, por el contrario, las gatas TRT presentaron alteraciones en el desarrollo folicular y en el endometrio. El estudio evidencia que en gatas la vacuna Improvac<sup>®</sup> suprime efectivamente el estro sin ocasionar graves efectos adversos.

**PALABRAS CLAVE:** gata, contraceptivo, inmunococtracepción, Improvac<sup>®</sup>, GnRH.

## SUMMARY

### EFFECT OF THE APPLICATION OF AN ANTI-GNRH VACCINE AS AN IMMUNO CONTRACEPTIVE METHOD IN QUEENS.

The effect of the Improvac<sup>®</sup> vaccine on the occurrence of the estrous in queens and its effect on the clinical parameter, hematology, biochemistry, E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, uterine diameter, and on ovarian and uterine morphometry was evaluated. Queens (n=12) belonging to the experimental colony of the chair of animal reproduction of the FCV of the UNLP were used. The queens were subjected to an artificial light regime (14h light, 10h dark), and the estrous cycle was determined by vaginal cytology every 48 hours. In group 1 (CON, n= 3) the queens received 0.5 mL of saline solution subcutaneously in the left rib cage on D1 (interestrus) and D30. In group 2 (TRT, n= 9) the queens received 0.5 mL of the Improvac<sup>®</sup> vaccine subcutaneously in the left rib cage on D1 and D30. Blood samples for hematology, biochemistry, E<sub>2</sub>, and P<sub>4</sub> were dropped every 15 days. CON queens were spayed on D90, and TRT queens were spayed on D120, D270, and D330. The data was analyzed using GLIMMIX of SAS<sup>®</sup> 9.4. All CON queens continued to cycle. In the TRT group, two (n=2/9) queens presented a post-vaccination estrus (D10 and D45) and subsequently did not cycle again until the day of spay (D270 and D120, respectively). Seven (n=7/9) queens did not become estrus after vaccination until the day they were castrated (D120-D330). Clinical, hematological, and biochemical parameters remained normal in the CON and TRT groups. P<sub>4</sub> concentrations remained baseline throughout the study in the CON and TRT groups. In the TRT group, there was a decrease in the diameter of

the uterine body. Histologically, the CON queens presented normal ovaries and endometrium. Conversely, TRT queens showed alterations in follicular development and the endometrium. The study shows that in queens the Improvac<sup>®</sup> vaccine effectively suppresses estrus without causing serious adverse effects.

**KEY WORDS:** queen, contraceptive, immunocontraception, Improvac<sup>®</sup>, GnRH.

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN GENERAL

Los gatos son una especie altamente prolífica y con gran adaptabilidad a diferentes entornos. Debido a esto las poblaciones de gatos pueden tener un grave impacto sobre el medio ambiente. Es así que en algunos países impactan negativamente sobre las especies locales (Aeluro y Kavanagh, 2021) y se han visto involucrados con la extinción de varias especies de animales entre las que se encuentran diversas especies de aves, reptiles y pequeños mamíferos (Doherty y col., 2017). Los gatos callejeros constituyen una fuente para la transmisión de enfermedades zoonóticas, además pueden ocasionar accidentes (mordeduras y arañazos) lo cual genera un deterioro de la calidad de vida de toda la población (Candela y col., 2022).

Para tratar de solucionar este problema, a nivel mundial se han llevado a cabo varios programas de control poblacional de gatos callejeros dirigidos a la protección de la salud pública, promoción de la salud y bienestar de los gatos, así como a la conservación de la vida silvestre. Estos programas por lo general tienen un alto costo económico, y en la mayoría de los casos no llegan a ser suficientemente efectivos para controlar las poblaciones de gatos callejeros debido al potencial reproductivo de estos, que supera las estrategias de control. Asimismo, deben considerarse las particularidades regionales que hacen que un programa brinde resultados aceptables en un lugar, pero puede que este no sea efectivo en otro. En consecuencia, los planes de control poblacional deben estar

estructurados de acuerdo con las características y necesidades de cada entorno (Hurley y Levy, 2022).

### **CONTROL POBLACIONAL**

Para el control de poblaciones felinas se han desarrollado programas en los cuales los animales son capturados y trasladados hacia albergues en donde pueden ser esterilizados y posteriormente adoptados o liberados. Además, en otros casos los animales que llegan a estos albergues pueden ser sacrificados (Janeczko, 2020). Otros tipos de programas involucran el control letal mediante la utilización de trampas, cebos envenenados y armas de fuego (Buckmaster y col., 2014; Rodríguez y col., 2006). Estos métodos son controvertidos tanto desde el aspecto ético como por su eficacia, ya que no se respeta a los animales como seres vivos y transgreden el bienestar animal.

Los programas que involucran la esterilización quirúrgica han demostrado ser efectivos en disminuir la población felina y mejorar el bienestar de los gatos, siempre y cuando sean ejecutados de manera constante y durante largos periodos de tiempo (Kreiser y col., 2019; Spehar y Wolf, 2019), a diferencia de lo que ocurre con los programas de corta duración que no logran contener el crecimiento poblacional (Bissonnette y col., 2018; Kilgour y col., 2017). Asimismo, los programas en los cuales los gatos son atrapados para ser esterilizados y posteriormente liberados tienen mejores resultados cuando se involucra la cantidad adecuada de animales y se toman en cuenta las necesidades de cada entorno en particular (Hurley y Levy, 2022).

Si bien estos programas son efectivos, la necesidad de llevar a cabo procedimientos quirúrgicos restringe su aplicación en lugares en donde el factor económico y profesional (Médicos Veterinarios capacitados en cirugía) es restringido lo cual limita la eficacia del plan. En consecuencia, encontrar alternativas no quirúrgicas es de importancia para que los programas sean sostenibles a largo plazo y obtener resultados satisfactorios. Es ahí donde entra en juego la utilización de anticonceptivos ya que su aplicación se puede llevar a cabo rápidamente, incrementando así la cantidad de animales en los que puede evitarse la reproducción mientras se implementan castraciones, permitiendo así mejorar la eficacia de los planes de esterilización quirúrgica (Carrasco Sangache y col., 2022). Sin embargo, deben considerarse los efectos adversos asociados a algunos anticonceptivos, lo cual hace necesario realizar investigaciones en esta área con el fin de desarrollar nuevos métodos que permitan controlar la reproducción sin afectar la salud animal.

## **CICLO ESTRAL DE LA GATA: ESTADIOS, ENDOCRINOLOGÍA Y CITOLOGÍA VAGINAL**

Para poder realizar el control del ciclo estral es necesario conocer la fisiología reproductiva felina (Davidson y Stabenfeldt, 2020a). La gata doméstica es poliéstrica estacional fotoperíodo positiva. Por lo tanto, la hembra ciclará de manera repetida durante una estación reproductiva (primavera y el verano, Davidson y Stabenfeldt, 2020b; Michel, 1993). Sin embargo, en las zonas ecuatoriales el periodo reproductivo ocurre a lo largo de todo el año (da Silva y col., 2006).

La estacionalidad reproductiva de la gata está determinada por el fotoperiodo y por la concentración sérica de melatonina (Leyva y col., 1984, 1989). La melatonina es una hormona que sigue un ritmo circadiano por lo tanto es sintetizada y secretada por la glándula pineal durante los periodos de oscuridad. Por el contrario, durante los periodos de luz la secreción y liberación de melatonina es inhibida (García Mitacek, 2016a; Simonneaux y Ribelayga, 2003). A medida que incrementan las horas de luz, disminuye el tiempo durante el cual se libera la melatonina y esto ocasiona una disminución en su concentración sérica (García Mitacek, 2016a). Esta disminución en la concentración de melatonina produce un incremento en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) dando inicio a la ocurrencia del ciclo estral cuando las gatas están expuestas al menos a 12 horas de luz (Schäfer-Somi, 2017)

En cambio, a medida que las horas de luz disminuyen el tiempo de liberación de la melatonina incrementa lo cual ocasiona que existan altas concentraciones séricas de melatonina. Por lo tanto, no se produce la liberación de GnRH ni la ocurrencia del ciclo estral (García Mitacek, 2016a).

Debido al efecto que tiene la luz sobre la concentración de melatonina y la ocurrencia del ciclo estral, es posible lograr que las gatas ciclen constantemente al ser expuestas artificialmente a más de 14 horas de luz al día (García Mitacek, 2016a, 2016b).

El ciclo estral se encuentra controlado por el eje hipotálamo pituitario gonadal, en el cual el hipotálamo produce GnRH. La GnRH es transportada hacia la adenohipófisis en donde estimula la producción de las hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) que son las hormonas responsables

del desarrollo y maduración de los folículos, y la ovulación (Davidson y Stabenfeldt, 2020b).

La FSH induce el desarrollo folicular ovárico y a medida que esto ocurre, los folículos empiezan a secretar estrógenos ( $E_2$ ) los cuales son responsables del comportamiento sexual característico del estro (Chiappe Barbará, 2018). Posteriormente para que la gata ovule es necesario la estimulación vaginal por parte del pene del macho, este estímulo ocasiona la liberación de GnRH y de LH. Sin embargo, se ha observado que algunas gatas pueden ovular de forma espontánea sin la estimulación vaginal (García Mitacek, 2016a).

Las etapas del ciclo estral felino son; proestro, estro, interestro y anestro (Feldman y Nelson, 2004). El proestro tiene una duración menor a 1 día, y esto hace que sea difícil de detectar. En esta etapa existe un incremento en la concentración de  $E_2$ , y pueden llegar a observarse concentraciones superiores a 20 pg/mL. (Feldman y Nelson, 2004). Este incremento en los niveles de  $E_2$  induce la diferenciación del epitelio vaginal, por lo que durante la citología vaginal se pueden observar principalmente células intermedias y células superficiales (<50%). El incremento de los niveles de  $E_2$  ocasiona leve edema vulvar, frotamiento de la gata contra objetos y vocalización, sin embargo durante el proestro la gata no acepta al macho (Johnson, 2022; Johnston y col., 2001).

Posteriormente ocurre el estro, durante esta etapa los niveles de  $E_2$  pueden ser superiores a 70 pg/mL, y la gata acepta al macho (Johnston y col., 2001). El rápido incremento y la elevada concentración de  $E_2$  ocasiona cambios conductuales en la gata, es así que puede observarse lordosis y lateralización de la cola, también puede existir vocalización intensa, micción y pisoteo con las patas

traseras, junto con la receptividad característica del estro (Vansandt, 2022). En la citología vaginal se observa un predominio de células superficiales (>75%) con y sin núcleo, junto a una disminución marcada de la cantidad de células intermedias (Johnson, 2022; Johnston y col., 2001).

En ausencia de apareamiento u ovulación espontánea comienza la etapa de interestro, en la cual no se observa comportamiento de celo debido al descenso en los niveles de E<sub>2</sub> hasta sus niveles basales (<20 pg/mL). La duración del interestro es de 8 a 9 días y en la citología vaginal se pueden observar células superficiales (<50%), intermedias grandes y parabasales (Feldman y Nelson, 2004; Johnson, 2022).

Si las gatas presentan ovulación inducida o espontánea y los ovocitos no son fertilizados, el cuerpo lúteo formado tras la ovulación ocasiona un incremento en los niveles de progesterona (P<sub>4</sub>) sérica, y ocurre un interestro prolongado o pseudogestación (Feldman y Nelson, 2004). El interestro prolongado tiene una duración aproximada de 40 días, y los niveles de P<sub>4</sub> ascienden desde <1 ng/mL hasta alcanzar niveles de entre 25-90 ng/mL (Vansandt, 2022). Luego las concentraciones de P<sub>4</sub> empiezan a disminuir lentamente a partir del día 25 hasta alcanzar niveles basales entre los 30-40 días. En el caso de que el interestro prolongado finalice durante la temporada reproductiva, la siguiente etapa que se presenta es el interestro, para posteriormente dar origen al estro y continuar con el ciclo mientras dure la temporada reproductiva. Por el contrario si el interestro prolongado finaliza durante la etapa no reproductiva las gatas pasan inmediatamente al anestro (Verstegen, 1998).

En cambio, si luego de la ovulación los ovocitos son fertilizados ocurre la gestación, aquí los niveles de P<sub>4</sub> incrementan hasta alcanzar un pico (35,52 ±6,14 ng/mL) a los 21 días de gestación, para luego disminuir ligeramente y mantenerse estable hasta aproximadamente 60 días luego de la ovulación coincidiendo con el momento del parto. En relación a los E<sub>2</sub>, sus niveles se mantienen basales a lo largo de la gestación, sin embargo incrementan su concentración a los 60 días de gestación para disminuir justo al momento previo al parto (England, 2010; Stornelli y García Mitacek, 2016).

Finalmente, el anestro es la ausencia del ciclo reproductivo y ocurre cuando disminuye el fotoperíodo, dura varios meses durante los cuales las gatas no atraen a los machos y no existe comportamiento sexual. Esta etapa se caracteriza por presentar niveles de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> basales, y altos niveles de melatonina. (Feldman y Nelson, 2004; García Mitacek, 2016a; Johnson, 2022). Debido a que no existe efecto estrogénico sobre el epitelio vaginal, en la citología se puede observar un predominio de células parabasales y una escasa cantidad de células intermedias (García Mitacek, 2016a).

## **MÉTODOS ANTICONCEPTIVOS**

La contracepción incluye el control definitivo y el control temporario reversible de la reproducción, Con el fin de lograr el control temporario de los ciclos estrales se han utilizado varias drogas a lo largo del tiempo, las cuales han demostrado diferentes grados de efectividad en las gatas (Carrasco Sangache y col., 2022). Los métodos anticonceptivos son económicos, fáciles de aplicar y son reversibles. Esto hace que sean de utilidad en la clínica diaria cuando se desea

suprimir el estro de forma temporal. Sin embargo, algunos de ellos producen graves efectos adversos y en otros la duración de su efecto no es predecible (Tabla 1.1). Diversos métodos anticonceptivos hormonales, así como inmunocontraceptivos han sido usados para el control de la reproducción en las gatas.

### **PROGESTÁGENOS**

Los anticonceptivos más utilizados a lo largo de los años han sido los progestágenos. Estos compuestos hormonales sintéticos tienen el mismo efecto que la P<sub>4</sub> endógena. Su efecto contraceptivo se debe a que ejercen retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo, hipofisiario gonadal con la consiguiente inhibición de la liberación de la hormona FSH y de la LH. Por lo tanto, ocurre la supresión del desarrollo folicular y la ovulación. Además, los progestágenos impiden el adecuado movimiento de los gametos por lo que interfieren con la implantación del embrión en el útero (Asa, 2018; Romagnoli, 2015).

La delmadinona y clormadinona son de los primeros progestágenos estudiados en gatas, los mismos demostraron ser efectivos al impedir e incluso interrumpir el estro, disminuyendo la atracción hacia los machos (Gerber y col., 1973; Jöchle y Jöchle, 1975; Murakoshi y col., 1996; Sawada y col., 1992; Tamada y col., 2003). Asimismo se utilizaron implantes de Levonorgestrel que también lograron impedir el estro, sin embargo para que su utilización sea práctica es necesario que se desarrollen implantes que contenga una mayor cantidad de levonorgestrel (Baldwin y col., 1994; Looper y col., 2001; Pelican y col., 2005).

El uso de anticonceptivos de uso humano que contenían una mezcla de levonorgestrel y etinilestradiol, no fue efectivo en gatas, produciendo incluso un incremento en la frecuencia de la ocurrencia del estro (Sarchahi y col., 2008). Otro progestágeno utilizado es el acetato de megestrol. Su administración también es efectiva para suprimir y prevenir el estro durante cortos periodos de tiempo (Tabla 1.1; Burke, 1982; Findik y col., 1999; Kutzler y Wood, 2006; Romagnoli, 2015).

Dentro de los progestágenos el más utilizado es el acetato de medroxiprogesterona, este ha sido estudiado con diferentes dosis y vías de administración demostrando ser altamente efectivo para prevenir el estro. A pesar de su alta efectividad su utilización está relacionada con graves efectos adversos como son: hiperplasia fibroepitelial mamaria, complejo hiperplasia endometrial quística, piometra y tumores mamarios (Carrasco Sangache y col., 2022; Colton, 1965; Harris y Wolchuk, 1963; Romagnoli, 2015; Sarchahi y col., 2008).

Tabla 1.1. Eficacia y efectos colaterales relacionados con la utilización de progestágenos en gatas

Progestágeno	Eficacia	Efectos colaterales	Referencias
Acetato delmadinona	de Previno el estro al menos un año		Gerber y col., 1973
Acetato clormadinona	de Previno el estro al menos un año	Ligero incremento del peso, y afecciones mamarias y uterinas	Jöchle y Jöchle, 1975; Murakoshi y col., 1996; Sawada y col., 1992; Tamada y col., 2003
Levonorgestrel	El efecto se mantuvo hasta la extracción de los implantes	Se observó malestar y vocalización durante la aplicación. Existió reacción local y dolor	Baldwin y col., 1994; Looper y col., 2001; Pelican y col., 2005
Acetato de megestrol	El efecto dura al menos 70 días	Piometra	Burke, 1982; Findik y col., 1999
Proligestona	El efecto dura en promedio 8,00 $\pm$ 2,20 meses	Hiperplasia fibroepitelial mamaria	Findik y col., 1999; Jackson, 1984; Vitásek y Dendisová, 2006
Altrenogest	Fue efectiva para suprimir el estro y el retorno del estro ocurre de 1-2 semanas luego de suspender el tratamiento		Stewart y col., 2010
Acetato de medroxiprogesterona	El efecto dura al menos 2 meses	Hiperplasia fibroepitelial mamaria, complejo hiperplasia endometrial quística, piometra y tumores mamarios.	Colton, 1965; Harris y Wolchuk, 1963; Keskin y col., 2009; Loretto y col., 2005; Romagnoli, 2015; Sarchahi y col., 2008

## **ANDRÓGENOS**

Los andrógenos ocasionan una retroalimentación negativa sobre la LH (Asa, 2018; Burke, 1976). Sin embargo, los andrógenos estudiados en gatas (mibolerona y la metiltestosterona), no lograron impedir el estro. Además, su utilización ocasionó incremento del tamaño del clítoris, disfunción tiroidea, engrosamiento de la dermis cervical y mortalidad debido a su efecto hepatotóxico (Burke, 1977, 1982; Sarchahi y col., 2008). Por todo esto, su utilización en gatas debe ser evitada.

## **MELATONINA**

La administración de melatonina exógena tiene un efecto contraceptivo debido a que la alta concentración de melatonina sérica ocasiona una disminución en la síntesis de GnRH impidiendo de esta manera la síntesis de gonadotropinas. Se han realizado estudios en los cuales se administró melatonina diariamente por vía oral, logrando de esta forma evitar la ocurrencia del estro (Faya y col., 2011; Graham y col., 2004). A pesar de que estos estudios demuestran la efectividad de la melatonina como anticonceptivo, la necesidad de que sea administrada diariamente por vía oral hace que sea poco practica para su utilización en la clínica diaria. Para evitar este inconveniente se realizaron estudios utilizando implantes subcutáneos de melatonina (18 mg) los cuales demostraron ser efectivos para prolongar el interestro sin ocasionar efectos adversos. La duración del efecto varía entre 61 y 277 días según el momento del ciclo en el cual se aplique el implante, es así que un implante no logra prevenir el estro durante toda la

temporada reproductiva (Faya y col., 2011; Furthner y col., 2020; Gimenez y col., 2009; Gulyuz y col., 2009; Nequinio y col., 2016).

### **ANÁLOGOS DE LA GNRH**

Los análogos sintéticos de la GnRH también se han utilizado para prevenir la ocurrencia del estro. Estos análogos pueden clasificarse de acuerdo con el efecto que tienen sobre sus receptores, es así que existen agonistas y antagonistas de la GnRH. Los agonistas de la GnRH pueden suprimir la producción de FSH y LH mediante desensibilización de las células gonadotropas en la pituitaria (Conn y Crowley, 1991). Para que ocurra esta desensibilización es necesario un estímulo constante de la GnRH sobre la pituitaria.

Con el fin de obtener el estímulo constante sobre la pituitaria se han desarrollado implantes de liberación lenta que contiene un agonista de la GnRH (deslorelina, 4,7 mg). La deslorelina tiene un efecto de entre 10 y 140 veces superior al de la GnRH, lo cual induce la desensibilización de los receptores de GnRH (Padula, 2005). Estos implantes aplicados por vía subcutánea han demostrado ser efectivos en prevenir el estro, sin embargo, debido a que tiene un efecto agonista, su aplicación induce la síntesis de gonadotropinas lo que desencadena el inicio del ciclo estral antes de que ocurra el efecto contraceptivo. Por esta razón luego de la colocación del implante las gatas pueden presentar signos de estro, atracción de los machos y receptividad sexual, si bien las gatas pueden quedar preñadas la gestación se pierde debido a la involución temprana que sufre el cuerpo lúteo.

Los implantes de deslorelina presentan como desventaja que la duración de su efecto no es predecible ya que se ha comunicado que el estro puede retornar entre 16-37 meses (Goericke-Pesch y col., 2013) y entre 8-38 meses (Furthner y col., 2020). Esto hace que sea difícil determinar el momento en el que se debe aplicar un nuevo implante en el caso de requerir continuar su utilización como método contraceptivo. Otro análogo de la GnRH que ha demostrado ser efectivo en gatas es la nafarelina, cuando se aplicaron implantes que combinaban azagly y nafarelina se logró prevenir la ovulación de las gatas hasta por 3 años (Rubion y Driancourt, 2009).

El efecto contraceptivo de los antagonistas de la GnRH se debe a que estos inhiben la síntesis de gonadotropinas, mediante la unión competitiva con los receptores de GnRH. Es así que no se estimula la activación de los receptores por lo tanto su efecto es inmediato, presentando como ventaja que no inducen el estro a diferencia de lo que ocurre con los agonistas de la GnRH (Al-Inany y col., 2016). Su efecto fue estudiado en algunas especies evitando los ciclos estrales (Pelican y col., 2005, 2008; Valiente y col., 2009; Watson y col., 2000). Para evaluar su utilidad en gatas se administraron dos dosis del antagonista de la GnRH antide con un intervalo de 15 días. En los dos estudios realizados se obtuvieron resultados diferentes a pesar de que se utilizó la misma dosis y esquema de aplicación (Pelican y col., 2005, 2008). Por el contrario, la administración de acilina no afectó la duración del estro en las gatas tratadas, esto demuestra que a diferencia de lo que sucede en otras especies los antagonistas de la GnRH no son efectivos en gatas (Pelican y col., 2005, 2008; Risso y col., 2010).

## INMUNOCONTRACCIÓN

Una de las alternativas para el control de la reproducción es la inmunocastración mediante la utilización de vacunas que induzcan la producción de anticuerpos dirigidos hacia los gametos o frente a las hormonas involucradas en la reproducción y sus receptores. Las vacunas de receptor de LH bovino, han demostrado ser efectivas en gatas, sin embargo son necesarias múltiples dosis para mantener el efecto contraceptivo (Saxena y col., 2003). Debido a esto su utilización es poco práctica, además son necesarios más estudios que evalúen su eficacia y seguridad.

Las vacunas también pueden dirigirse contra la zona pelúcida, estas vacunas están orientadas a inducir la formación de anticuerpos contra la zona pelúcida y de esta manera interferir con la interacción entre los gametos para finalmente impedir la fertilización. Con este fin se desarrollaron vacunas de zona pelúcida procedente de diferentes especies (cerdo, vaca, perra visón y hurón), si bien estas vacunas indujeron la formación de anticuerpos estos no presentaron reacción cruzada frente a la zona pelúcida felina (Eade y col., 2009; Gorman y col., 2002; Ivanova y col., 1995; Levy y col., 2005). En relación a los mencionados estudios, se utilizaron vacunas con zona pelúcida felina, no obstante, estas vacunas tampoco fueron capaces de inducir la producción de anticuerpos. Las vacunas de ADN con subunidades proteicas de zona pelúcida felina si lograron producir bajos niveles de anticuerpos, sin embargo, al comparar la tasa de concepción con la del grupo control no se observaron diferencias significativas (Eade y col., 2009). Si bien estas vacunas han demostrado ser efectivas en varias

especies animales los diversos estudios realizados en gatas demuestran que no son efectivas como método contraceptivo en esta especie.

Las vacunas contraceptivas que han demostrado mayor efectividad en felinos son las vacunas anti-GnRH. Sin embargo, solamente la vacuna GonaCon™ se ha evaluado en gatas, produciendo diferentes resultados entre los estudios realizados (Fischer y col., 2018; Levy y col., 2011).

En los últimos años se han desarrollado varias vacunas, las cuales han demostrado inducir la formación de anticuerpo en ratonas (Sandam y col., 2022, 2021; Schaut y col., 2018), ratas (Ahn y col., 2021; Junco y col., 2021; Massei y col., 2020; Pinkham y col., 2022), perras (Gupta y col., 2022) y gatas (Cho y col., 2022). Sin embargo, a pesar de inducir la formación de anticuerpos, la mayoría de ellas tuvieron escaso efecto sobre la reproducción, observándose solo una disminución en el tamaño de las camadas.

Un nuevo candidato de vacuna anti-GnRH que requiere una sola dosis y cuya administración es oral o subcutánea ha demostrado ser efectiva en inducir la formación de altos niveles de anticuerpos anti-GnRH en ratonas y cerdas, sin presentar efectos adversos. Sin embargo, son necesarios futuros estudios que demuestren su efectividad y seguridad en diferentes especies (Faruck y col., 2021).

Debido a la necesidad de encontrar métodos contraceptivos efectivos para la utilización en gatas, y a la disponibilidad de vacunas anti-GnRH que han demostrado ser efectivas en diferentes especies, es necesario evaluar su eficacia y seguridad en gatas. Por ello los objetivos de la presente tesis fueron:

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la eficacia de la vacuna anti-GnRH Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) en hembras felinas sobre el control de la reproducción.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar el efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) sobre la ocurrencia de celos en gatas adultas.
- Estudiar el efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) sobre la concentración sérica de hormonas esteroideas sexuales.
- Estudiar el efecto de la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) sobre la morfología y morfometría ovárica y uterina.

Para cumplir con estos cuatro objetivos se realizaron los experimentos que se describen en los capítulos siguientes.

## CAPITULO II

### **EFEECTO DE LA APLICACIÓN DE DOS DOSIS DE LA VACUNA ANTI-GNRH COMO MÉTODO INMUNO CONTRACEPTIVO EN GATAS**

#### **INTRODUCCIÓN**

La GnRH es un decapeptido sintetizado en el hipotálamo y esta hormona es un importante regulador de la reproducción. La GnRH es secretada por neuronas del hipotálamo y a través de los vasos sanguíneos portales se dirige hacia la pituitaria anterior. Al llegar a la pituitaria se une a sus receptores en las células gonadotropas y esto desencadena la síntesis y liberación de gonadotropinas (FSH y LH) que actuarán sobre el ovario promoviendo el desarrollo folicular y la ovulación (Maggi, 2016).

En el ovario la FSH se une a sus receptores y esto promueve el desarrollo de los folículos mediante la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa junto a la formación del antro folicular (Hunzicker-Dunn y Mayo, 2015). Posteriormente para que se lleve a cabo la ovulación es necesario que la LH se una a sus receptores en el ovario, esta unión desencadena la expansión de las células del complejo cumulus-ovocito, la ruptura de las uniones gap, la reanudación de la meiosis del ovocito y la liberación del complejo cumulus-ovocito, para culminar con la formación del cuerpo lúteo (Richards y col., 2015).

El importante rol que cumple la GnRH sobre la reproducción hace que esta hormona sea un importante objetivo sobre el cual pueden actuar las vacunas anticonceptivas. Los anticuerpos formados por estas vacunas podrían suprimir el

efecto de la GnRH y esto llevaría a que se inhiba la síntesis de gonadotropinas, evitando de esta manera la reproducción.

La GnRH es un decapeptido poco antigénico, por lo tanto, para producir vacunas la GnRH debe ser conjugada con proteínas que mejoren su reconocimiento por parte del sistema inmune. Asimismo es necesario que estas vacunas contengan adyuvantes que desencadenen una respuesta inmune adecuada (Levy, 2011). El mecanismo de acción de estas vacunas se basa en inducir la formación de anticuerpos contra la GnRH y evitar la unión de la hormona con sus receptores, para de esta manera inhibir la síntesis de FSH y LH con la consecuente supresión de la gametogénesis.

Se han desarrollado diversas vacunas anti-GnRH que han sido efectivas para inhibir la reproducción en diferentes especies animales. Una vacuna que se ha estudiado en gatas es GonaCon™, observándose en los primeros estudios que la aplicación de una dosis tuvo efecto contraceptivo en el 100% de las gatas tratadas (n=15). Sin embargo, la duración de su efecto varió entre 5 meses a más de 5 años. Además dentro del grupo tratado 5 gatas desarrollaron masas no dolorosas en el sitio de aplicación luego de la vacunación durante el tratamiento y hasta dos años posteriores a la vacunación (Levy y col., 2011).

Posteriormente se realizaron estudios dirigidos a evaluar la eficacia y seguridad de una nueva fórmula de la vacuna GonaCon™, para ello dividieron los animales en dos grupos aplicándose una (n=3) y dos dosis (n=3) según el grupo. Las gatas vacunadas produjeron anticuerpos dentro de los 30 días posteriores a la vacunación y no se observaron reacciones adversas agudas. Sin embargo, a partir de los 18 días post vacunación, dos gatas de cada grupo desarrollaron masas de

tejido blando en el sitio de aplicación sin presentar signos de dolor o dificultad para deambular (Vansandt y col., 2017).

Un nuevo estudio se realizó para determinar la duración del efecto de una dosis de la nueva fórmula de GonaCon™ y confirmar su seguridad. Para ello se administró 0,5 mL de la vacuna por vía intramuscular a 20 gatas y luego de cuatro meses se introdujeron gatos fértiles para simular un ambiente de colonia. El 60% (n=12/20) de las gatas vacunadas quedaron preñadas dentro de los 4 meses de la introducción de los machos y finalmente el 70% (n=14/20) quedaron preñadas dentro del año del tratamiento. En cuanto a las reacciones adversas se observó que 7 gatas desarrollaron masas en el sitio de aplicación y dos gatas presentaron inflamación sin masas palpables en el sitio de aplicación. Los efectos adversos observados no ocasionaron dolor ni dificultad para deambular (Fischer y col., 2018).

Asimismo, se evaluó la eficacia y seguridad a corto plazo de la vacunación con GonaCon™ junto con una vacuna antirrábica en gatas. Para ello el primer grupo (n=5) recibió una dosis de GonaCon™ junto a la vacuna antirrábica, y el segundo grupo (n=4) recibió una dosis de GonaCon™ y luego de tres semanas una segunda dosis de GonaCon™ junto con la vacuna antirrábica. Posterior a la vacunación se observó que todas las gatas (excepto una gata del segundo grupo) formaron anticuerpos contra la GnRH, sin presentar diferencias significativas entre ambos grupos. Además, debido a los cambios en las concentraciones de la hormona antimülleriana, la citología vaginal y la histología ovárica los autores sugieren que se suprimió la actividad ovárica por al menos tres meses (Novak y

col., 2021). Sin embargo, se requieren más estudios para comprobar su efectividad a largo plazo.

Como se puede apreciar GonaCon™ tiene efectividad contradictoria en gatas, posiblemente la vacuna requiera modificaciones en su composición para incrementar su efectividad y evitar las reacciones locales que se observan luego de su aplicación. Además, esta vacuna se encuentra disponible solamente para el control de especies silvestres. Otras vacunas anti-GnRH aún se encuentran en desarrollo por lo cual su disponibilidad para evaluarlas en otras especies es limitada.

Los diferentes resultados obtenidos en los estudios que utilizaron GonaCon™ en gatas, hace necesario la evaluación de otras vacunas anti-GnRH potencialmente efectivas en esta especie. Improvac® es una vacuna anti-GnRH disponible comercialmente. Esta vacuna está indicada en cerdos, para eliminar el olor sexual de los machos enteros, como una alternativa a la castración quirúrgica. Está compuesta por un análogo sintético e incompleto de la GnRH unido al toxoide de la difteria el cual actúa como proteína transportadora (Wicks y col., 2013). Debido a que Improvac® tiene una GnRH estructuralmente incompleta y además se encuentra conjugada con el toxoide de la difteria, la unión de la vacuna con los receptores de GnRH en la pituitaria no es posible, lo cual evita que la vacuna tenga efecto hormonal (Hennessy, 2008).

El efecto contraceptivo de Improvac® se ha estudiado en diferentes especies. En un estudio realizado en cerdas se pudo observar que la duración de la inmunidad fue de hasta 20 semanas en el 93% de las cerdas que recibieron 3 dosis y de al menos 13 semanas en el 100% de las cerdas que recibieron 4 dosis.

Además, el inicio del efecto fue de alrededor de 10 días luego de la aplicación de la segunda dosis (Dalmau y col., 2015).

En yeguas (n=9) se aplicaron 2 dosis de la vacuna Improvac® con un intervalo de cuatro semanas por vía intramuscular en el cuello. En el grupo tratado se observó que todas las yeguas dejaron de ciclar dentro de las 8 semanas posteriores a la primera dosis y el efecto se mantuvo por al menos 23 semanas. Pudo observarse hinchazón y dolor en el sitio de aplicación, rigidez del cuello, pirexia y apatía. Los mencionados efectos adversos disminuyeron entre 4 y 5 días luego de la aplicación de cada dosis (Imboden y col., 2006). Botha y col. evaluaron el efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac® con un intervalo de 35 días en 55 yeguas. Los resultados obtenidos mostraron que al día 70 de la aplicación de la primera dosis no se registró actividad ovárica en las yeguas vacunadas a diferencia del grupo control (n=10) en el cual todas las yeguas mostraron actividad ovárica. Los efectos adversos observados fueron hinchazón en el sitio de aplicación y cojera los cuales desaparecieron al día 6 (Botha y col., 2008). Además, en el 92,2% de las yeguas existió retorno de la actividad ovárica dentro de los 720 días con un intervalo promedio de 417,8 días posteriores a la vacunación. Esto evidencia que su efecto es reversible y de larga duración (Schulman y col., 2012).

Resultados similares fueron obtenidos por Nolan y col., quienes estudiaron en yeguas el efecto de 2 dosis de la vacuna Improvac® con un intervalo de 5 semanas. Luego de la primera dosis 2 de 8 yeguas aun evidenciaban actividad ovárica, sin embargo luego de 5 semanas de la segunda dosis no se observó

actividad ovárica en ninguna yegua vacunada a diferencia del grupo control en el cual 5 de 8 yeguas mantuvieron su actividad ovárica normal (Nolan y col., 2018).

En ponis (n=3) también se observó la producción de anticuerpos mediante la aplicación de 3 dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup>. El nivel de anticuerpos varió entre los ponis, observándose una disminución de los niveles de P<sub>4</sub> entre 4-16 semanas luego de la primera dosis. Como efectos adversos se observó fiebre y ligera hinchazón en el sitio de aplicación de la vacuna (Khumsap y col., 2020).

En terneras la vacuna Improvac<sup>®</sup> fue aplicada para retardar la pubertad, aplicándose 2 dosis de la vacuna con un intervalo de 6 semanas. En el grupo tratado se observó que solamente el 12,5% (n=3/24) de las terneras presentaron niveles de P<sub>4</sub> superiores a 1 ng/mL, a diferencia del grupo control en el cual el 56,5% (n=13/23) presentaron concentraciones superiores a 1 ng/mL. A diferencia de lo observado en otras especies, esta vacuna no produjo reacciones locales en el sitio de aplicación de la vacuna (Schütz y col., 2021). De la misma forma en vacas adultas (n=20) la aplicación de 2 dosis de Improvac<sup>®</sup> con un intervalo de 35 días, suprimió el estro en promedio 114 días (Schmid y col., 2020).

El efecto contraceptivo de la vacuna Improvac<sup>®</sup> fue probado también en especies silvestres. En elefantas (n=8) la aplicación de dos dosis de la vacuna no fue efectiva para inducir el anestro. Según los autores la falta de efectividad pudo deberse a una sub-dosificación de la vacuna, ya que para su aplicación se utilizó un sistema de dardos. Otro punto a tener en cuenta es la revacunación tardía implementada, ya que esta se llevó a cabo entre 5 a 7 semanas luego de la primera dosis. Asociado al sitio de aplicación vacunal se pudo observar la presencia de ligera hinchazón que resolvió dentro de 2 semanas (Benavides Valades y col.,

2012). En concordancia con lo ocurrido en elefantas, en jirafas la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> no fue efectiva como método contraceptivo. Contrariamente, la administración de 3 dosis con un intervalo de 4 semanas si logró tener efecto contraceptivo. Sin embargo, para mantener su efecto son necesarias dosis de refuerzo cada 2 meses durante el primer año para posteriormente incrementar el intervalo entre los refuerzos. Las jirafas vacunadas presentaron ligera hinchazón edematosa en el sitio de aplicación (Schwarzenberger y col., 2022). Otro estudio realizado en jirafas mostró que la aplicación de dos dosis con un intervalo de 4 semanas junto con posteriores dosis de refuerzo cada 3 meses, fueron capaces de suprimir la actividad ovárica. Debido a que se observó que el inicio del efecto no es inmediato se recomienda separar a las hembras de los machos o aplicar métodos contraceptivos alternativos hasta obtener el efecto de la vacuna (Moresco y col., 2022).

También se comunicó la utilización de la vacuna Improvac<sup>®</sup> en una leona que recibió dos dosis los días 0 y 109. En ella el efecto contraceptivo se observó luego de la aplicación de la segunda dosis y el efecto se mantuvo durante 246 días. Luego de la aplicación de la segunda dosis se observó una ligera hinchazón en el sitio de la inyección la cual fue visible durante un día (Kawase y col., 2021). Este estudio sugiere que la vacuna Improvac<sup>®</sup> también puede ser efectiva como método contraceptivo en leonas.

Las vacunas anti-GnRH, disponibles actualmente en el mercado son Improvac<sup>®</sup> (Improvect<sup>®</sup>) y Bopriva<sup>®</sup> comercializadas por Zoetis Inc. Debido a la disponibilidad de Improvac<sup>®</sup> y a la efectividad que se ha observado en las diferentes especies, su utilización en gatas es una alternativa que puede

reemplazar a los métodos contraceptivos actuales disponibles. Considerando que en nuestro país solo se cuenta con progestágenos para evitar la reproducción felina, y que estos poseen importantes efectos colaterales adversos, es necesario evaluar el efecto que tiene la vacuna sobre el ciclo estral, parámetros clínicos, sanguíneos, ultrasonografía uterina, concentración de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> sérica y la morfología ovárica y uterina en gatas.

El objetivo de este capítulo fue estudiar en gatas el efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) sobre la ocurrencia de celos, los parámetros clínicos, hematológicos, bioquímicos y ultrasonográficos uterinos, así como su efecto sobre la concentración sérica de hormonas esteroideas sexuales.

Nuestras hipótesis de trabajo fueron: 1) La aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> aumenta el interestro sin provocar efectos adversos en hembras felinas, 2) Las concentraciones séricas de las hormonas esteroideas sexuales en hembras vacunadas con Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) difieren de las observadas en hembras controles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Las gatas incluidas en el estudio fueron divididas en 2 grupos: grupo I control al cual se le administró por vía sc en la parrilla costal izquierda 0,5 mL de solución fisiológica el día uno (primer día de interestro) y el día 30 (CON, n=3). A las gatas asignadas al grupo II tratado se le administró por la misma vía y en la misma ubicación 0,5 mL de la vacuna Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) en el día uno y el día 30 (TRT, n=9; Figura 2.1).

Las gatas TRT fueron sometidas a ovariectomía (OVH) durante el estudio, 3 gatas fueron sometidas a OVH a los 120 días, 3 gatas fueron sometidas a OVH a los 270 días y 3 gatas fueron sometidas a OVH a los 330 días de la aplicación de la primera dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup>. Las gatas controles fueron sometidas a OVH 90 días después de la aplicación de la primera dosis de solución fisiológica.

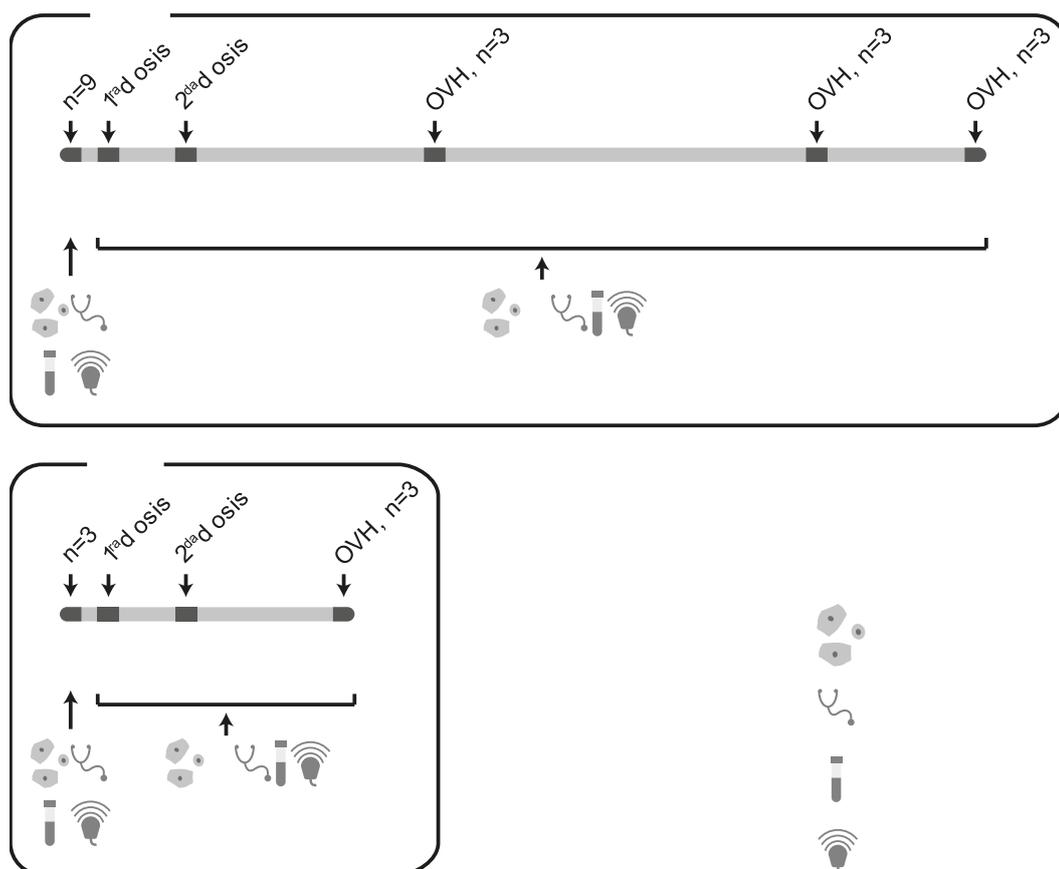


Figura 2.1. Diseño experimental para el estudio del efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> (TRT) o solución fisiológica (CON) en gatas.

### ***Animales***

Para el estudio se utilizaron 12 gatas mestizas de entre 1 y 5 años con peso de entre 2,5-4 kg. Las gatas incluidas en el estudio pertenecían a la colonia experimental felina de la Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP y fueron alojadas en jaulas individuales (0,75 x 1,50 x 2 m) con ambiente climatizado. Las gatas recibieron agua *ad libitum* y alimento premium (Balanced; Vitalcan<sup>®</sup>, Buenos Aires, Argentina). Previo al inicio del experimento a las gatas se les realizó un examen clínico y ginecológico completo. Para obtener ciclicidad durante los 45 días previos al inicio del estudio

y hasta el final de este las gatas fueron sometidas a un régimen de luz artificial de fotoperiodo largo de 14 horas de luz utilizando lámparas led de 1200 lúmenes. Luego de la ocurrencia de 3 celos consecutivos las gatas fueron incluidas en el estudio y al finalizar el mismo ingresaron en un plan de control urbano de la reproducción.

### ***Determinación del ciclo estral***

La etapa del ciclo estral fue determinada mediante citología vaginal y la evaluación de los signos conductuales. Para el estudio citológico se tomaron muestras mediante hisopado vaginal, posteriormente las muestras fueron teñidas con Tinción 15<sup>®</sup> (Biopur) y evaluadas con un microscopio óptico a 100X y 400X. Asimismo cada 48 horas se evaluó la presencia de los signos característicos del estro (vocalización, lordosis, frotamiento contra objetos).

### ***Determinación de los parámetros clínicos***

Se registró la temperatura corporal (TE), pulso femoral (PF), frecuencia respiratoria (FR) y condición corporal (CC) previo a la vacunación durante el primer día de estro citológico (D0), el día de la aplicación de la primera dosis (D1; primer día del interestro), a los 15 días (D15), el día de la aplicación de la segunda dosis (D30) y luego cada 15 días. Asimismo, se registraron los parámetros clínicos cuando se observó el primer estro posvacunal.

Se registró la CC de las gatas cada 15 días, para ello se observó y palpó la grasa subcutánea sobre las costillas y los procesos espinosos, y se les asignó un

valor en la escala de 1 a 5 en donde 1 = caquéxico, 2 = bajo peso, 3 = ideal, 4 = sobrepeso, 5 = obeso (Kronfeld y col., 1994).

La ingesta de agua, comida, características de la materia fecal y conducta del animal fue registrada diariamente. Conjuntamente se evaluó el sitio de aplicación de la vacuna o solución fisiológica diariamente luego de su administración.

### ***Muestras de sangre para determinaciones hematológicas, bioquímicas y hormonales***

Se tomaron muestras sanguíneas para hematología, bioquímica sérica y para determinar las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas previo a la vacunación durante el primer día del estro citológico (D0), el día de la aplicación de la primera dosis (D1; primer día del interestro), a los 15 días (D15), el día de la aplicación de la segunda dosis (D30) y luego cada 15 días durante todo el estudio. Asimismo, se tomaron muestras cuando se observó el primer estro posvacunal.

Todas las muestras de sangre fueron extraídas por punción de la vena yugular. Las muestras para hematología fueron colectadas en tubos con anticoagulante EDTA y procesadas utilizando un analizador hematológico semiautomatizado, y el conteo diferencial de leucocitos se realizó en frotis teñidos con May-Grünwald Giemsa. Las muestras para las determinaciones bioquímicas (a excepción de la glucemia) y hormonales fueron colectadas en tubos sin anticoagulante, luego de la formación del coágulo sanguíneo las muestras fueron centrifugadas y el suero fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento. Las

muestras para determinación de la concentración sérica de glucosa se obtuvieron en un tubo con anticoagulante de Fluoruro de Potasio y se procesaron dentro de las 12hs de obtenida la muestra.

Se determinó las concentraciones séricas de proteínas totales (PT), albumina (ALB), globulinas (GLOB), glucosa (GLU), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), urea (UREA) y creatinina (CRE) mediante un autoanalizador (InCCA DICONEX Ltd, Quilmes, Argentina) utilizando kits de bioquímica (Wiener Laboratories, Rosario, Argentina).

La determinación de la concentración sérica de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> se realizó mediante la técnica de quimioluminiscencia (Elecsys®, Progesterone II, and Estradiol Roche, Mannheim, Germany)

### ***Determinación del diámetro del cuerpo uterino***

Se realizó la medición del diámetro del cuerpo uterino (DCU) mediante la imagen congelada de un corte longitudinal (cm) a nivel del cuerpo uterino de las gatas CON y TRT mediante ecografía (DP-30 Vet Mindray™, Nanshan, China, sonda lineal multifrecuencia [5-7,5-10 MHz]). Las mediciones se realizaron durante el primer día del estro citológico previo a la vacunación (D0), el día de la aplicación de la primera dosis (D1; primer día del interestro), a los 15 días (D15), el día de la aplicación de la segunda dosis (D30) y luego cada 15 días durante todo el estudio. Asimismo, se realizó la determinación del diámetro del cuerpo uterino cuando se observó el primer estro posvacunal.

### ***Criterios de inclusión***

Las gatas fueron incluidas en el estudio considerando los siguientes criterios de inclusión: 1) madurez sexual, 2) peso igual o superior a 2,5 kg e igual o inferior a 4 kg, 3) plan sanitario completo, 4) adecuado estado nutricional, 5) no gestantes, 6) no presentar alteraciones durante al examen físico, 7) no estar recibiendo ningún tipo de medicación, 8) presentar 3 estros normales de forma consecutiva.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con mediciones repetidas en el tiempo en el que la unidad experimental fue la gata. Se estableció un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . Los datos obtenidos fueron analizados mediante GLIMMIX de SAS<sup>®</sup> (9.4). Los datos se han expresados mediante cuadrados mínimos  $\pm$  el error estándar.

## **MARCO BIOÉTICO**

Los experimentos se realizaron respetando las recomendaciones internacionales especificadas en la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, con las recomendaciones de la National Academy Science, Washington DC, USA, referidas al uso de gatas como animales de laboratorio (National Research Council, 2011) y las recomendaciones sobre el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio del Comité Institucional de Cuidado y Uso de

Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados siguiendo las indicaciones sobre el cuidado de los animales de experimentación indicados en la Guía internacional de principios para investigaciones biomédicas que involucran animales (CIOMS y ICLAS, 2012). Además, el experimento contó con la aprobación del CICUAL de la FCV UNLP (101-9-19T)

## RESULTADOS

Todas las gatas del grupo CON continuaron ciclando y presentaron celos cada 12-20 días hasta el D90 en el que fueron sometidas a OVH. En el grupo TRT 7 (n = 7/9) gatas no volvieron a ciclar hasta el día en el que fueron sometidas a OVH (entre 120 a 330 días). Por el contrario 2 gatas (n = 2/9) presentaron un estro luego de la aplicación de la primera dosis de la vacuna, una al D10 y otra al D45, posteriormente estas gatas no volvieron a ciclar hasta el día en el que fueron sometidas a OVH (270 y 120 días, respectivamente).

Ninguna gata del grupo CON presentó reacciones adversas luego de la vacunación. Por el contrario, todas las gatas del grupo TRT desarrollaron masas no dolorosas de entre 0,4 y 5,5 cm, en el sitio de aplicación de la vacuna. Estas masas aparecieron entre el día 3 a 33 luego de la aplicación de la primera dosis. En 5 gatas las masas desaparecieron luego de 105, 147, 158, 224 y 349 días luego de su aparición. En las 4 gatas restantes las masas continuaron presentes hasta el día de la cirugía y el tiempo desde su aparición fue de 121, 126, 219 y 329 días. Asimismo 2 gatas (n = 2/9) del grupo TRT presentaron decaimiento, disminución de la ingesta de alimento y fiebre un día después de la aplicación de la primera dosis y la fiebre se mantuvo durante 1 día. Además, 1 a 2 días después de la vacunación 3 gatas (n = 3/9) del grupo TRT presentaron dolor en el sitio de aplicación de la vacuna y decaimiento durante un día.

### Parámetros clínicos

Al analizar los parámetros clínicos a lo largo del experimento no se observaron diferencias significativas en el PF, FR y CC, entre los grupos CON y TRT (Tabla 2.1 - 2.2 y Figura 2.2). Además, el PF, FR y CC se encontraron dentro de los rangos fisiológicos normales para la especie (Kronfeld y col., 1994; Quimby y col., 2011). Luego de que las gatas TRT que presentaron fiebre posvacunal, retornaran a su TE normal, no se observaron diferencias significativas en la TE entre las gatas CON y TRT.

Tabla 2.1. Cuadrados mínimos  $\pm$  error estándar de los parámetros clínicos (TE, PF, FR, CC) entre el grupo CON y TRT.

Parámetro clínico	Valores normales	CON	TRT	P
Temperatura (TE; °C)	37-38,8	38,2 $\pm$ 0,2	38,5 $\pm$ 0,03	>0,25
Pulso femoral (PF; ppm)	110-250	158,4 $\pm$ 2,8	159,8 $\pm$ 1,3	>0,64
Frecuencia respiratoria (FR; rpm)	24-84	47,3 $\pm$ 1,5	49,3 $\pm$ 0,8	>0,26
Condición corporal (CC)	3	2,8 $\pm$ 0,07	2,77 $\pm$ 0,03	>0,13

rpm: respiraciones por minuto, ppm: pulsos por minuto, °C: grados centígrados

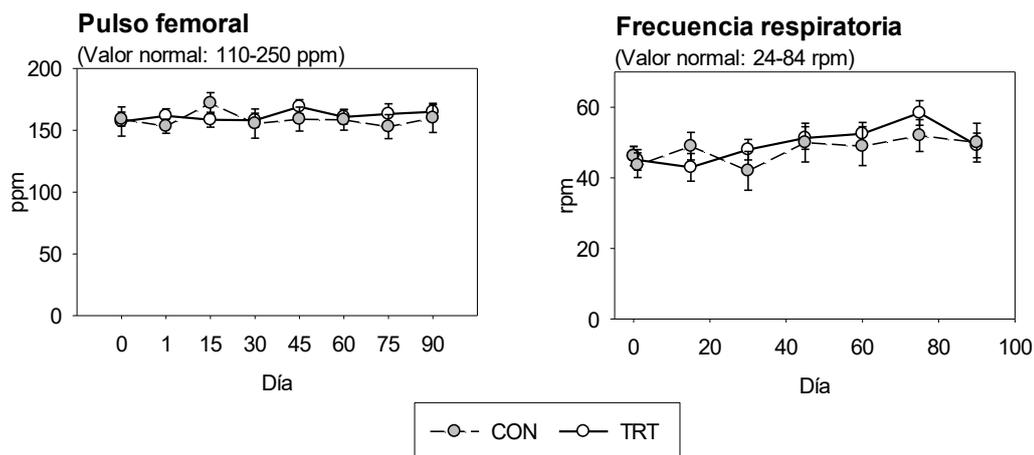


Figura 2.2. Cuadrados mínimos  $\pm$  error estándar del pulso femoral y frecuencia respiratoria entre las gatas CON y TRT desde el D0 al D90. ppm: pulsos por minuto, rpm: respiraciones por minuto

Tabla 2.2. Cuadrados mínimos  $\pm$  error estándar de la condición corporal (CC) entre las gatas CON y TRT desde el D0 al D90

Día de tratamiento	CON	TRT	P
D0	2,88 $\pm$ 0,16	2,77 $\pm$ 0,16	>0,63
D1	2,88 $\pm$ 0,16	2,77 $\pm$ 0,16	>0,63
D15	2,66 $\pm$ 0,21	2,77 $\pm$ 0,16	>0,68
D30	2,46 $\pm$ 0,27	2,66 $\pm$ 0,16	>0,53
D45	2,93 $\pm$ 0,23	2,66 $\pm$ 0,16	>0,34
D60	2,93 $\pm$ 0,21	2,66 $\pm$ 0,16	>0,31
D75	2,93 $\pm$ 0,21	2,61 $\pm$ 0,16	>0,24
D90	2,86 $\pm$ 0,27	2,55 $\pm$ 0,16	>0,33

### Evaluación de los parámetros hematológicos

Al analizar los parámetros hematológicos no se observaron diferencias significativas en los valores asociados a la serie roja al comparar CON vs. TRT

(Tabla 2.3). Contrariamente, en el leucograma se observó que los LEU, NEU, LIN, MON y BAS fueron significativamente superiores (Tabla 2.3) en el grupo TRT en comparación con el grupo CON. Sin embargo, todos los parámetros del grupo CON y TRT se mantuvieron dentro del intervalo normal para la especie. Asimismo, todos los parámetros hematológicos tanto del grupo CON como del grupo TRT se encontraron dentro del intervalo de referencia para la especie desde el D0 (Primer día del estro) al D90 en el grupo CON y hasta el final del estudio en el grupo TRT (Figura 2.3 y 2.4).

En relación con los sólidos totales (ST), no se observaron diferencias significativas entre las gatas del grupo CON y TRT a lo largo del experimento ( $7,54 \pm 0,4$  vs.  $7,95 \pm 0,19$ , respectivamente,  $P > 0,3$ ). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en la concentración ST entre el grupo CON y TRT en los días D0-D90 (Figura 2.3). En el grupo TRT no se observaron diferencias en la concentración de sólidos totales entre el D0 y el D1-D330.

Tabla 2.3. Cuadrados mínimos  $\pm$  error estándar de los parámetros hematológicos entre el grupo CON y TRT desde el D0 al D90

Parámetro	Valores normales	CON	TRT	P
ERI ( $10^6/\mu\text{L}$ )	5000-10000	7357,74 $\pm$ 168,77	7640,24 $\pm$ 81,67	>0,13
HTO (%)	24-45	37,16 $\pm$ 0,52	36,51 $\pm$ 0,25	>0,27
HB (g/dL)	8-15	12,33 $\pm$ 0,18	12,14 $\pm$ 0,08	>0,33
LEU ( $/\mu\text{L}$ )	5500-19500	7146,22 $\pm$ 629,52	11628 $\pm$ 304,63	<0,0001
NEU ( $/\mu\text{L}$ )	1000-14000	4291,61 $\pm$ 496,71	7343,28 $\pm$ 237,09	<0,0001
BAN ( $/\mu\text{L}$ )	<585	0 $\pm$ 6,5	11,09 $\pm$ 3,11	>0,12
LIN ( $/\mu\text{L}$ )	1100-10000	1710,67 $\pm$ 249,29	2573,36 $\pm$ 118,99	<0,002
MON ( $/\mu\text{L}$ )	<1500	492,93 $\pm$ 86,84	858,79 $\pm$ 41,45	<0,0002
EOS ( $/\mu\text{L}$ )	100-2500	603,01 $\pm$ 89,79	757,95 $\pm$ 42,86	>0,12
BAS ( $/\mu\text{L}$ )	<150	24,3 $\pm$ 19,54	86,5 $\pm$ 9,32	<0,004

ERI: eritrocitos, HTO: hematocrito, HB: hemoglobina, LEU: leucocitos, NEU: neutrófilos, BAN, neutrófilos en banda, LIN: linfocitos, MON, monocitos, EOS: eosinófilos, BAS: basófilos

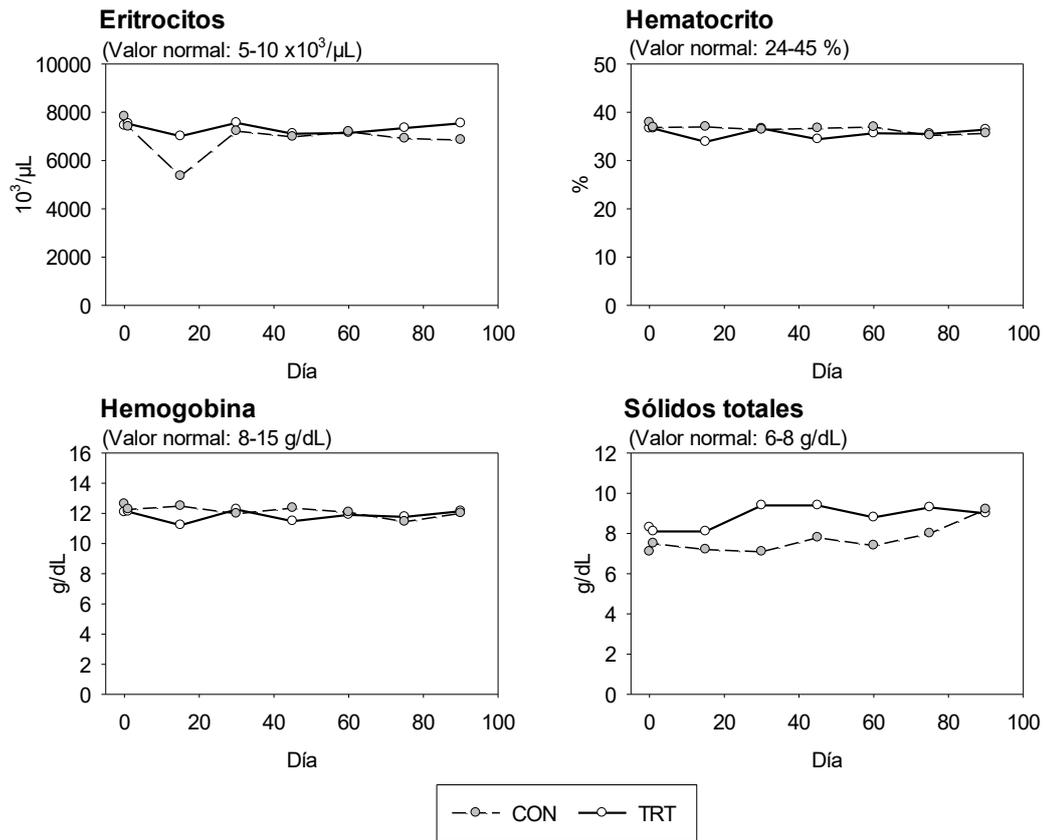


Figura 2.3. Cuadrados medios mínimos de los parámetros hematológicos y de la concentración de ST en los grupos CON y TRT desde el D0 al D90

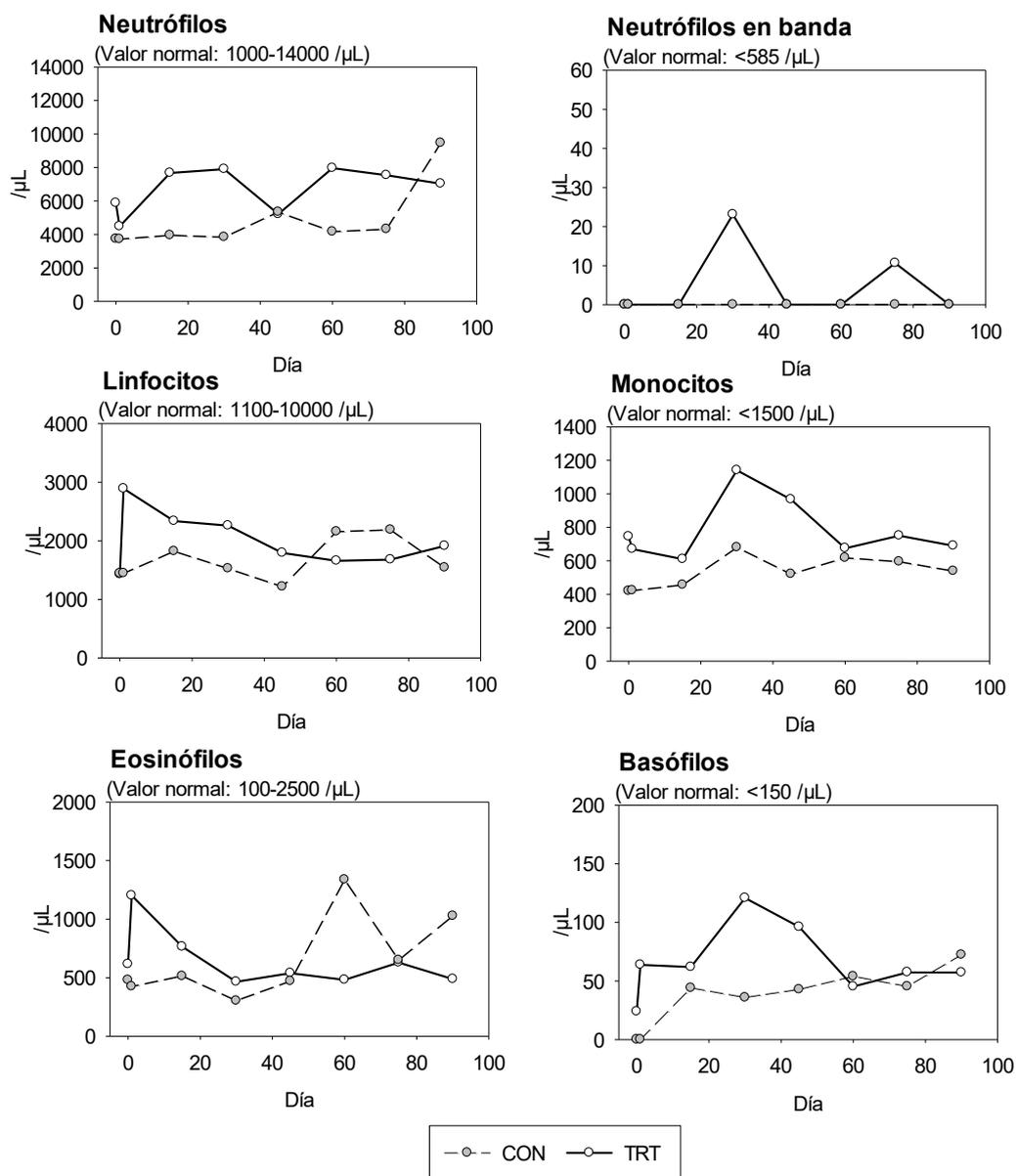


Figura 2.4. Cuadrados medios mínimos del conteo diferencial de leucocitos en los grupos CON y TRT desde el D0 al D90

### Evaluación de los parámetros bioquímicos

En relación con los parámetros bioquímicos no se observaron diferencias significativas en la concentración de PT, ALB, GLOB, GLU, ALT, AST, UREA y CRE entre el grupo CON y TRT (Tabla 2.4).

Asimismo, la concentración de todos los parámetros bioquímicos en los grupos CON y TRT se mantuvieron dentro de los intervalos de referencia para la especie durante el D0 (Primer día del estro) al D90 en el grupo CON y hasta el final del estudio en el grupo TRT (Figura 2.5).

Tabla 2.4. Cuadrados mínimos  $\pm$  error estándar de los parámetros bioquímicos entre el grupo CON y TRT desde el D0 al D90

Analito	Valores normales	CON	TRT	P
PT (g/dL)	6-7,9	7,76 $\pm$ 0,12	7,92 $\pm$ 0,05	>0,22
ALB (g/dL)	2,4-3,9	2,49 $\pm$ 0,02	2,46 $\pm$ 0,00	>0,29
GLOB (g/dL)	2,6-5,1	5,27 $\pm$ 0,12	5,47 $\pm$ 0,05	>0,13
GLU (mg/dL)	70-130	74,79 $\pm$ 2,20	73,82 $\pm$ 0,95	>0,24
ALT (UI/L)	<145	12,67 $\pm$ 1,46	14,83 $\pm$ 0,065	>0,18
AST (UI/L)	<42	16,60 $\pm$ 1,05	16,25 $\pm$ 0,47	>0,76
UREA (mg/dL)	32-70,62	41,25 $\pm$ 2,02	42,65 $\pm$ 0,89	>0,52
CRE (mg/dL)	<2,2	0,89 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,01	>0,93

PT: proteínas totales, ALB: albumina, GLOB: globulinas, GLU: glucosa, ALT: alanina aminotransferasa, AST: aspartato aminotransferasa, UREA: Urea, CRE: creatinina

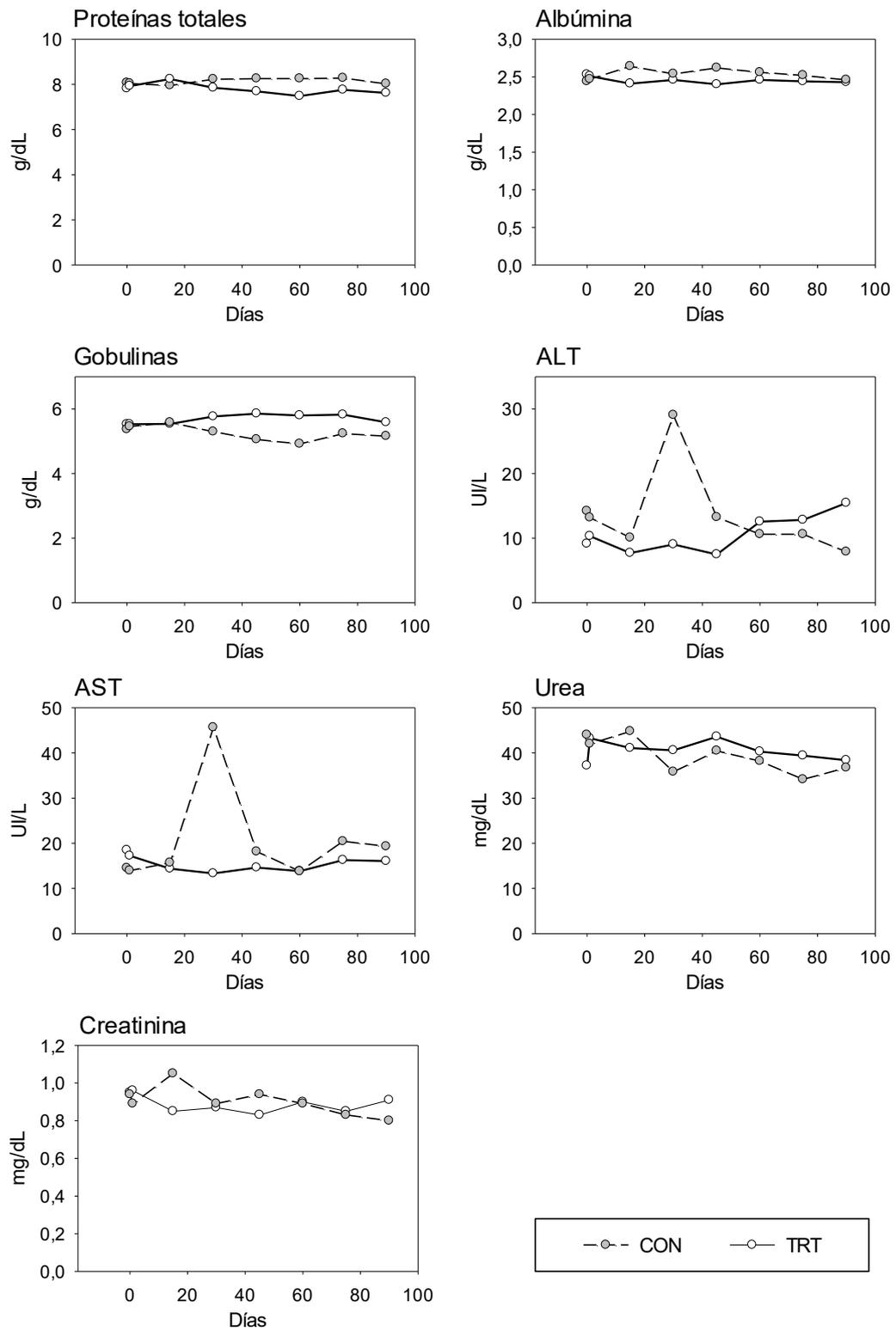


Figura 2.5. Cuadrados medios mínimos de las concentraciones de PT, ALB, GLOB, ALT, AST, UREA y CRE en los grupos CON y TRT desde el D0 al D90

### Evaluación de las concentraciones de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>

La concentración de E<sub>2</sub> durante el primer día del estro previo a la vacunación (D0) fue similar en las gatas CON y TRT ( $20,66 \pm 8,74$  vs.  $27,22 \pm 8,47$  pg/mL,  $P > 0,60$ ; respectivamente). Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre el grupo CON y las dos gatas TRT que volvieron a ciclar luego del tratamiento ( $26,85 \pm 6,58$  pg/mL vs.  $27,22 \pm 9,8$  pg/mL,  $P > 0,97$ ).

En cuanto a la concentración de P<sub>4</sub> no existió diferencia significativa entre los grupos CON y TRT ( $0,51 \pm 0,07$  ng/mL vs.  $0,50 \pm 0,08$  ng/mL,  $P > 0,94$ ) durante el día de la aplicación de la primera dosis de la vacuna (D1; primer día del interestro). Las concentraciones séricas de P<sub>4</sub> se mantuvieron basales durante todo el estudio en los grupos CON y TRT (Figura 2.6).

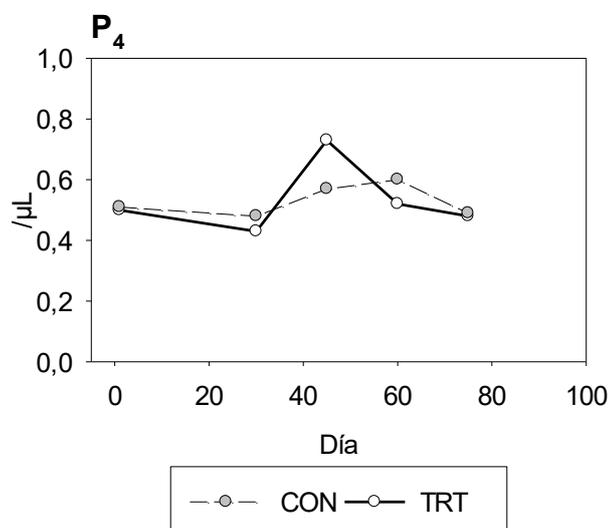


Figura 2.6. Concentración de P<sub>4</sub> en las gatas del grupo CON y TRT desde el D0 al D90

### Evaluación ultrasonográfica del diámetro del cuerpo uterino

La evaluación ultrasonográfica del diámetro del cuerpo uterino (DCU) mostró diferencias significativas entre las gatas CON y las TRT ( $0,44 \pm 0,01$  vs.

0,29  $\pm$ 0,00,  $P < 0,0001$ ; Figura 2.7) a lo largo del experimento. Asimismo, en las gatas del grupo TRT se observó una reducción del DCU, pudiendo evidenciarse diferencias significativas entre el D1 (Primer día del interestro) vs. D60-D300 (Figura 2.8).

Asimismo, se observaron diferencias significativas en el DCU entre el primer día del estro previo a la vacunación (D0) y el día de la aplicación de la primera dosis de la vacuna (Interestro; D1) tanto en las gatas CON (D0 = 0,47  $\pm$ 0,02; D1 = 0,40  $\pm$ 0,02;  $P < 0,05$ ) como en las gatas TRT (D0 = 0,42  $\pm$ 0,01; D1 = 0,35  $\pm$ 0,02;  $P < 0,009$ ).

En el grupo CON no se observaron diferencias significativas (Figura 2.7) en el DCU entre el D0 (Estro) y los días D15, D30, D45, D60, D75 y D90 ( $P > 0,98$ ,  $P > 0,38$ ,  $P > 0,67$ ,  $P > 0,59$ ,  $P > 0,06$ ,  $P > 0,43$ ; respectivamente)

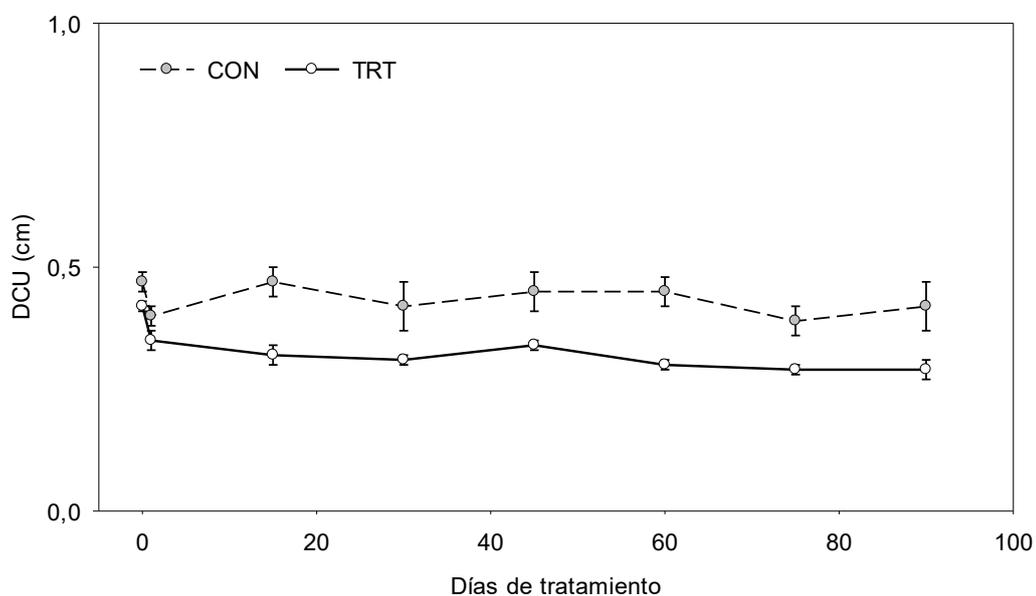


Figura 2.7. Cuadrados mínimos  $\pm$  error estándar del DCU (cm) entre las gatas del grupo CON y TRT desde el D0 al D90

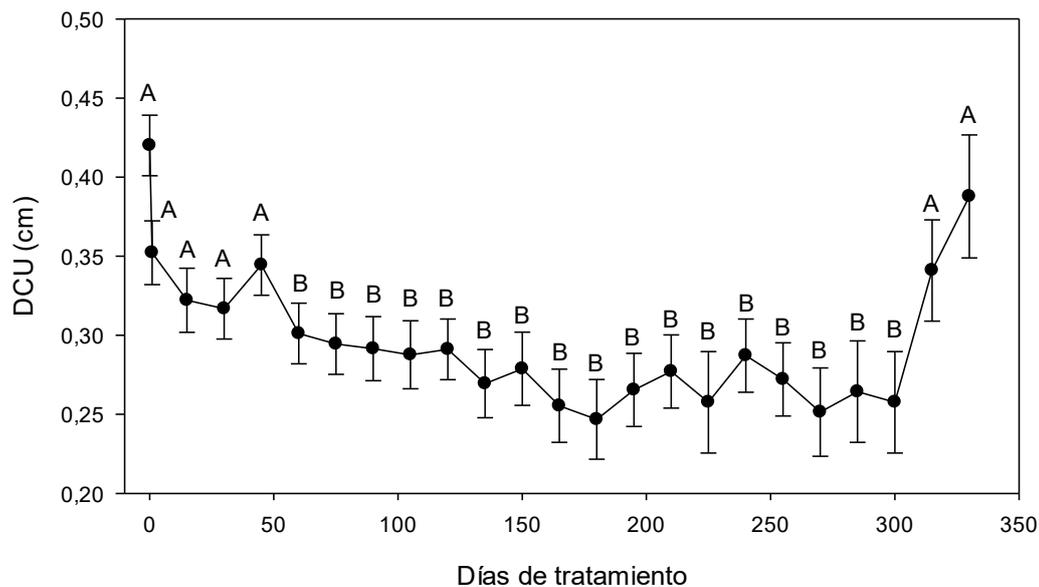


Figura 2.8. Cuadrados medios mínimos  $\pm$  error estándar del DCU (cm) de las gatas TRT desde el día 0 al día 345. Superíndices difieren a  $P < 0,0001$

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que tal como fue hipotetizado Improvac® evita la ocurrencia de ciclos estrales por al menos 330 días, lo cual cubriría una temporada reproductiva en las gatas, evitando preñeces no deseadas y previniendo la ocurrencia de poblaciones de gatos callejeros.

En los resultados obtenidos pudimos observar que la aplicación de la vacuna Improvac® no produjo alteraciones en el PF, FR y CC. Sin embargo, como efectos adversos luego de la vacunación se observó la formación de masas en el sitio de aplicación de la vacuna que permanecieron durante periodos variables de tiempo, y en dos animales se registró dolor, fiebre y decaimiento sólo el día siguiente a la aplicación de la vacuna. Estas observaciones concuerdan los efectos adversos observados en yeguas, ponis y cerdos tras la vacunación con Improvac®

(Dunshea y col., 2001; Imboden y col., 2006; Khumsap y col., 2020). Asimismo otra vacuna anti-GnRH (GonaCon™) aplicada en gatas ocasionó la formación de masas en el sitio de aplicación de la vacuna, y al igual que en nuestro experimento estas masas disminuyeron su tamaño o desaparecieron y no tuvieron características neoplásicas ni formaron lesiones supurativas (Levy y col., 2011; Vansandt y col., 2017). En el trabajo realizado por Robbins y col., (2004) también se observó que en las gatas luego de la aplicación de una vacuna anti-GnRH existió reacción tisular en el sitio de aplicación. Algunos estudios indican que en gatos la aplicación de vacunas se asocia al riesgo de formación de sarcomas en el sitio de inyección. En nuestro trabajo no se registró la ocurrencia de sarcomas lo cual muestra la inocuidad de la vacuna Improvac (Gobar y Kass, 2002; Srivastav y col., 2012).

La duración del efecto de la vacuna, en nuestro estudio fue similar a lo observado al utilizar GonaCon™ en gatas (Levy y col., 2011) y al utilizar Improvac® en yeguas (Schulman y col., 2012). Por el contrario la duración del efecto registrado por nosotros fue superior a lo observado por Fischer y col., (2018) al utilizar una nueva formulación de GonaCon™ en gatas; y a lo observado en vacas al utilizar la vacuna Improvac® (Schmid y col., 2020).

El estro que se observó en algunas gatas luego de la vacunación es similar a lo que observaron Dalmau y col., (2015) al utilizar Improvac® en cerdas y esto pudo deberse a que la vacuna no tuvo el tiempo suficiente para formar anticuerpos e iniciar su efecto contraceptivo o a variaciones individuales entre los animales (Levy y col., 2011; Novak y col., 2021).

En cuanto al efecto de la vacunación sobre los parámetros bioquímicos no observamos diferencias y los parámetros se mantuvieron dentro del intervalo normal para la especie, nuestros resultados concuerdan con lo observado al utilizar otra vacuna anti-GnRH en gatas (Novak y col., 2021), vacas y jabalíes (Massei y col., 2008, 2012, 2015). Estos resultados estarían relacionados con la inocuidad de la vacuna Improvac<sup>®</sup> en gatos.

En cuanto al efecto de la vacunación sobre la concentración de hormonas esteroideas sexuales, no se observaron diferencias en la concentración de E<sub>2</sub> entre las gatas CON y TRT que ciclaron pos aplicación de la vacuna, estos resultados son similares a los observados por Imboden y col., (2006) en yeguas quienes observaron que la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> no influye sobre la concentración de E<sub>2</sub>. Por el contrario en un estudio realizado por Elhay y col., (2007) se registró una disminución en los niveles de E<sub>2</sub> luego de la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> en yeguas, tal como se observa en las gatas que no ciclaron luego de la aplicación de la vacuna.

En yeguas la aplicación de la vacuna Improvac<sup>®</sup> previene la foliculogénesis y la formación del cuerpo lúteo (Elhay y col., 2007) lo cual concordaría con la ausencia de estros pos vacunales observada en nuestro estudio.

Los niveles basales de P<sub>4</sub> que observamos en las gatas CON y TRT demuestra la ausencia de ovulación espontánea en las gatas (Johnson, 2022), por lo tanto la ausencia del ciclo estral que observamos no fue consecuencia de la formación de un cuerpo lúteo.

Al analizar el DCU entre las gatas CON y TRT pudimos observar una disminución en las gatas TRT en comparación con las gatas CON. El mayor DCU

observado en las gatas CON se debe a que las gatas de este grupo continuaron presentando estros durante el periodo de observación. Estos resultados concuerdan con lo manifestado por Davidson y Baker (2009) quienes mencionan que durante el estro el útero tiene mayor grosor en comparación con el útero durante el anestro. Asimismo se ha observado que en gatas existe correlación positiva del diámetro uterino y el tamaño de los folículos ováricos (Gatel y col., 2020).

## CONCLUSIÓN

Podemos concluir que la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> evitan la ocurrencia del estro en gatas. Nuestros resultados evidencian que el inicio del efecto de la vacuna no es igual en todas las gatas. Sin embargo, una vez que se ha logrado el efecto contraceptivo la duración de su efecto es prolongada. Los efectos adversos que observamos fueron leves y transitorios y la inocuidad de la vacuna se confirmó al observar que su utilización no ocasionó alteraciones hematológicas y bioquímicas. Por estos motivos esta vacuna puede ser utilizada como un método contraceptivo en gatas.

### **CAPITULO III**

## **EFEECTO DE LA APLICACIÓN DE DOS DOSIS DE LA VACUNA ANTI-GNRH SOBRE LA MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DEL ÚTERO Y OVARIO**

### **INTRODUCCIÓN**

La GnRH es la hormona que desencadena el inicio del ciclo estral gracias a la estimulación de la pituitaria promoviendo la síntesis y liberación de gonadotropinas. Durante el ciclo estral estas hormonas producen cambios en la estructura ovárica debido a su efecto sobre el desarrollo folicular, la maduración del folículo y la ovulación. Asimismo, el útero también sufre cambios estructurales, y estos consisten en un incremento en la cantidad y la extensión de las glándulas endometriales, junto con edema y la congestión del endometrio, cambios asociados a la producción ovárica de estrógenos y progesterona (Johnston y col., 2001).

El ovario es el lugar en donde se lleva a cabo el desarrollo y maduración folicular, así como la ovulación, además es el lugar en donde se sintetiza E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>. Histológicamente el ovario de la gata está formado por una corteza externa y por una medula interna (Samuelson, 2007).

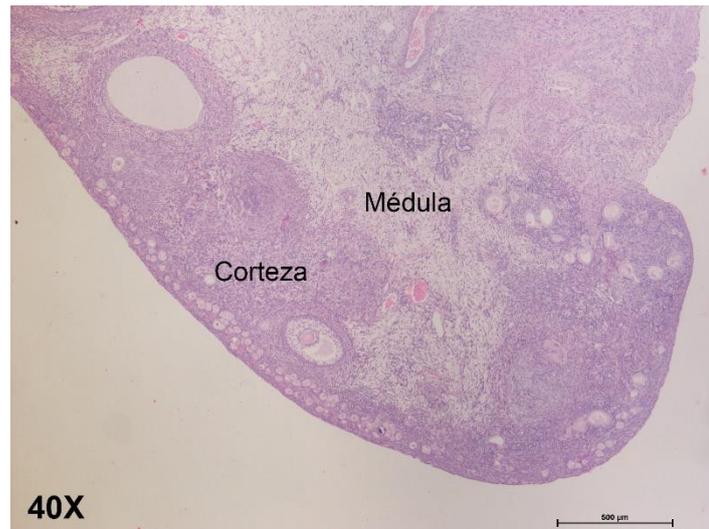


Figura 3.1. Corte histológico de un ovario de gata teñido con hematoxilina y eosina, visto a 40X en donde se observa la médula y corteza ovárica conteniendo folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo

En la corteza ovárica se localizan los folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo, estos folículos son estructuras compuestas por un ovocito primario rodeado por células epiteliales especializadas. Bajo la influencia de la FSH estos folículos sufren una serie de cambios estructurales y esto permite que se puedan identificar cuatro etapas de desarrollo según sus características histológicas. Las etapas por las que atraviesa el folículo ovárico durante su desarrollo son: folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios y folículos terciarios (Priedkalns y Leiser, 2006; Samuelson, 2007).

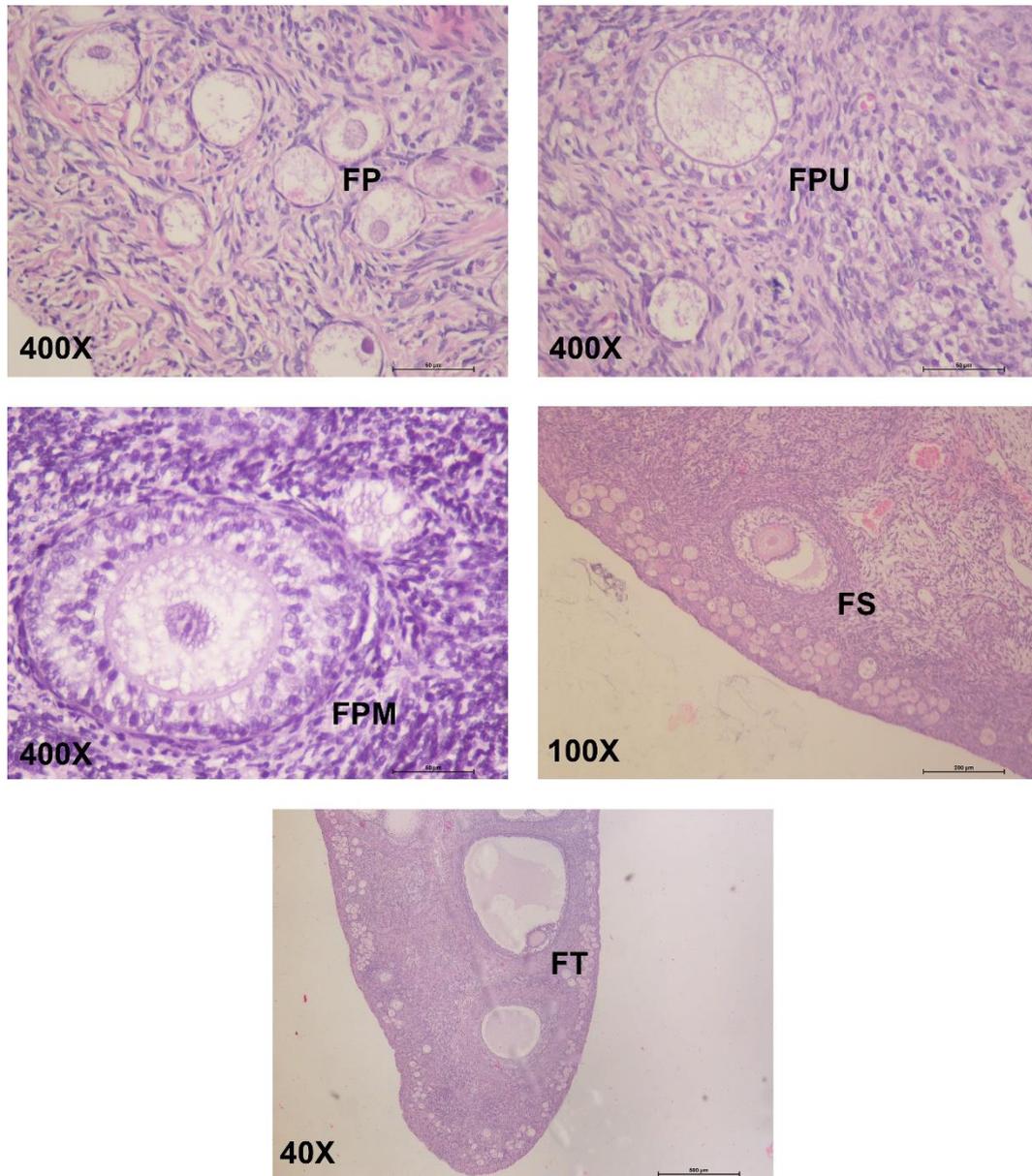


Figura 3.2. Folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo. FP: folículo primordial, FPU: folículo primario unilaminar, FPM: folículo primario multilaminar, FS: folículo secundario, FT: folículo terciario

Los folículos primordiales son la primera etapa del desarrollo folicular, durante esta etapa el ovocito mide entre 20-30  $\mu\text{m}$ , y se encuentra rodeado por una capa de células foliculares planas. Estos folículos se encuentran inactivos para posteriormente ser activados y pasar a convertirse en folículos primarios (Bristol-Gould y Woodruff, 2006; Liebich, 2019). La siguiente etapa del desarrollo

folicular consiste en la formación de los folículos primarios, estos folículos se caracterizan porque el ovocito en su interior incrementa de tamaño (30-50  $\mu\text{m}$ ), se forma la zona pelúcida que recubre al ovocito y las células foliculares planas que lo rodeaban se convierten en células cuboidales. Sin embargo, estas células, aún se mantienen distribuidas en forma de una monocapa (Bristol-Gould y Woodruff, 2006; Samuelson, 2007).

A medida que continúa el desarrollo folicular las células que rodean al ovocito empiezan a dividirse formando un revestimiento epitelial estratificado, y debido a este incremento en la cantidad de células y a su disposición multilaminar el folículo incrementa su tamaño alcanzando 100-400  $\mu\text{m}$ , formando de esta manera el folículo secundario. En esta etapa las células foliculares que rodean al ovocito pasan a llamarse células de la granulosa, y se mantienen separadas del ovocito por la zona pelúcida. Durante esta etapa las células del estroma ovárico que rodean al folículo empiezan a dividirse y se organizan alrededor del folículo y al mismo tiempo se forman vasos sanguíneos alrededor del mismo lo que da origen a la teca folicular. En el interior del folículo secundario el ovocito presenta un tamaño de entre 40-75  $\mu\text{m}$  (Bristol-Gould y Woodruff, 2006; Samuelson, 2007).

Posteriormente, continúa la proliferación de las células de la granulosa y a medida que esto ocurre empiezan a formarse espacios llenos de líquido folicular entre estas células, formando así el folículo terciario. Según avanza el desarrollo estos espacios empiezan a fusionarse para finalmente formar el antro lleno de líquido folicular. Durante esta proliferación celular el ovocito junto con las células de la granulosa que lo rodean son desplazados hacia un costado del antro

formando el complejo cumulus-ovocito. Asimismo, las células de la teca se dividen en dos porciones una interna vascular llamada teca interna y una externa con tejido conectivo llamada teca externa. Durante esta etapa el ovocito mide de 85-100  $\mu\text{m}$  (Bristol-Gould y Woodruff, 2006; Liebich, 2019).

Una vez que el folículo se desarrolla por completo y alcanza la maduración el complejo cumulus-ovocito se desprende del resto de las células foliculares y se mueve libremente dentro del antro listo para la ovulación (folículo preovulatorio; Samuelson, 2007).

El útero felino está formado por tres capas perimetrio, miometrio y endometrio. El endometrio está formado por dos capas, una capa superficial llamada zona funcional y una profunda llamada zona basal. La zona funcional en su superficie está formada por epitelio columnar simple que varía de tamaño según las variaciones hormonales durante el ciclo estral. La zona subepitelial es vascular y contiene tejido conectivo laxo junto con fibrocitos, macrófagos y mastocitos. La zona funcional degenera parcialmente luego de la preñez o el estro y luego es restaurada a partir de la zona basal (Priedkalns y Leiser, 2006). Desde el epitelio del endometrio hasta el miometrio se encuentran las glándulas uterinas, las cuales son estructuras glandulares cilíndricas, ramificadas y enrolladas, cuya cantidad de enrollamiento se encuentra relacionado con la secreción de  $\text{P}_4$  (Samuelson, 2007).

Asimismo, durante el ciclo estral el endometrio también sufre cambios en su estructura, es así que durante el anestro existen pocas capas de glándulas endometriales que luego proliferan durante la fase folicular, para finalmente tener

una apariencia elongada que recorre el endometrio durante la fase lútea (Chatdarong y col., 2005).

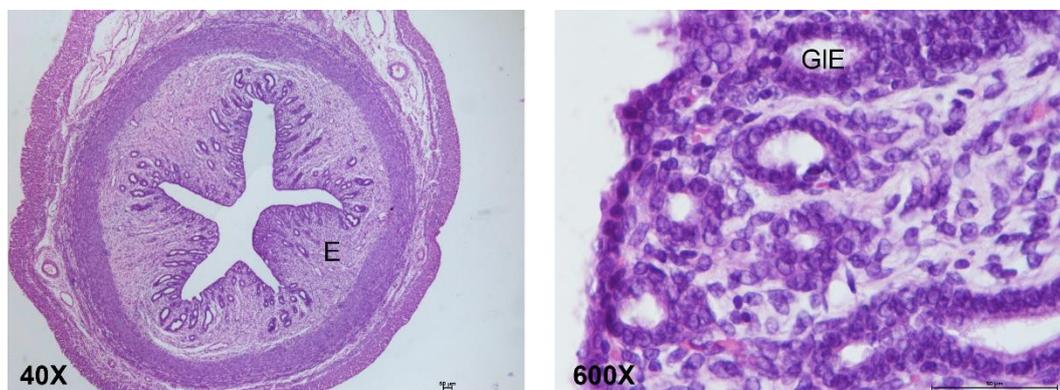


Figura 3.3. Corte histológico transversal del útero de una gata teñido con hematoxilina y eosina a 40X y 600X. E: endometrio, GIE: glándulas endometriales.

Debido a la importancia que tiene la GnRH para la ocurrencia del ciclo estral y en relación a los cambios que ocasiona en el tejido ovárico y uterino, es esperable que las vacunas anti-GnRH interfieran con el desarrollo folicular y los cambios en la estructura del endometrio. Es así que se ha observado que en yeguas las vacunas anti-GnRH ocasionan una disminución en la cantidad y tamaño de los folículos ováricos detectados mediante palpación y ecografía (Donovan y col., 2013; Elhay y col., 2007). Asimismo en perras la aplicación de una vacuna anti-GnRH impidió la formación de folículos antrales (Liu y col., 2015). De la misma manera en gatas las vacunas anti-GnRH impidieron el desarrollo de los folículos ováricos (Jiang y col., 2015; Novak y col., 2021)

En un reciente estudio realizado en gatas se aplicaron dos dosis de la vacuna anti-GnRH GonaCon™, y esto ocasionó una disminución en la cantidad y tamaño de los folículos antrales junto con degeneración de sus ovocitos. Sin

embargo no se observaron cambios en los folículos primordiales ni en el endometrio (Novak y col., 2021),

El efecto de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre los ovarios fue estudiado en cerdas y se observó que las cerdas vacunadas tuvieron una mayor cantidad de folículos atrésicos y folículos terciarios de menor tamaño en comparación con el grupo control. Además, el endometrio del grupo de cerdas vacunadas fue más delgado y contenía un menor número de glándulas endometriales (Mitjana y col., 2020)

De la misma forma en yeguas se observó que la aplicación de 2 dosis de la vacuna anti-GnRH Improvac<sup>®</sup> produjo una disminución en la cantidad de folículos detectados mediante ecografía. Asimismo, se observó una menor cantidad de edema uterino en comparación al grupo control, lo cual coincidió con el cese de la actividad ovárica de las yeguas vacunadas (Imboden y col., 2006).

Esto demuestra que las vacunas anti-GnRH interfieren con el desarrollo folicular y uterino, lo cual permite estimar el efecto contraceptivo de estas vacunas. Por tal motivo evaluar el efecto que tiene la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> sobre el tejido ovárico y uterino en gatas permitirá estimar su efecto contraceptivo, así como también las modificaciones que induzcan en estos tejidos. El objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) sobre la morfología y morfometría ovárica y uterina en hembras felinas.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> produce cambios histológicos y morfométricos ováricos y uterinos en hembras felinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Diseño experimental**

Las gatas incluidas en el estudio fueron divididas en 2 grupos: grupo I control al cual se le administró por vía sc en la parrilla costal izquierda 0,5 mL de solución fisiológica el primer día del interestro (D1) y el día 30 (CON, n=3) y grupo II tratado al cual se le administró por la misma vía y en la misma ubicación 0,5 mL de la vacuna Improvac<sup>®</sup> (Zoetis) el primer día del interestro (D1) y el día 30 (TRT, n=9).

Las gatas TRT fueron sometidas a ovariectomía (OVH) durante el estudio, 3 gatas fueron sometidas a OVH a los 120 días, 3 gatas fueron sometidas a OVH a los 270 días y 3 gatas fueron sometidas a OVH a los 330 días de la aplicación de la primera dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup>. Las gatas controles fueron sometidas a OVH 3 meses después de la aplicación de la primera dosis de solución fisiológica.

### ***Animales***

Los animales fueron mantenidos respetando los mismos criterios descritos en el Capítulo II.

### ***Determinación del ciclo estral y examen físico***

La determinación de la etapa del ciclo estral se realizó respetando los mismos criterios descritos en el Capítulo II.

Durante el estudio cada 15 días se realizó un examen físico general, y se registró la TE, PF, FR y CC.

### ***Muestras para el estudio morfológico uterino***

Una vez realizada la ovariectomía, se obtuvo de cada cuerno uterino una biopsia mediante punch de 0,4 cm de diámetro. Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos con solución formolada tamponada al 10% hasta su procesamiento histológico. Posteriormente en el laboratorio, las muestras fueron deshidratadas, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo y teñidas con hematoxilina y eosina para su observación. Todas las muestras obtenidas fueron evaluadas a 100 y 400X en microscopio óptico (Praderio y col., 2019)

### ***Muestras para el estudio morfológico ovárico***

Los ovarios obtenidos durante la OVH fueron fijados en solución formolada tamponada al 10%. Posteriormente en el laboratorio, las muestras fueron deshidratadas, incluidas en parafina y cortadas con micrótopo. Las muestras de ovarios fueron teñidas con hematoxilina y eosina para su observación a 100 y 400X en microscopio óptico (Stornelli y col., 2021).

### ***Estudio morfométrico uterino***

En los cortes histológicos del útero se evaluó el grosor endometrial (GE,  $\mu\text{m}$ ) y la morfometría de las glándulas uterinas en cada cuerno uterino de las gatas estudiadas.

El GE se registró midiendo la altura de 5 picos y 5 depresiones observadas en el endometrio de cada cuerno uterino observado a 40X. Posteriormente se calculó el promedio para cada cuerno uterino.

En las glándulas endometriales se registró la altura celular glandular (ACG,  $\mu\text{m}$ ), el diámetro glandular interno (DGI,  $\mu\text{m}$ ) y el diámetro glandular externo (DGE,  $\mu\text{m}$ ).

La ACG se registró utilizando 5 campos observados a 600X, en los cuales se utilizaron 2 glándulas endometriales por campo, y en cada glándula se midió la altura celular de 5 células glandulares, midiéndose de esta manera la altura celular de 50 células glandulares por cada cuerno uterino.

El DGI Y DGE se registró utilizando 5 campos observados a 600X, en los cuales se utilizaron 2 glándulas endometriales por campo, y en cada glándula se midió el DGI y DGE en dos ejes perpendiculares por cada glándula endometrial. Obteniendo 20 mediciones del DGI y 20 mediciones del DGE por cada cuerno uterino (Figura 3.4).

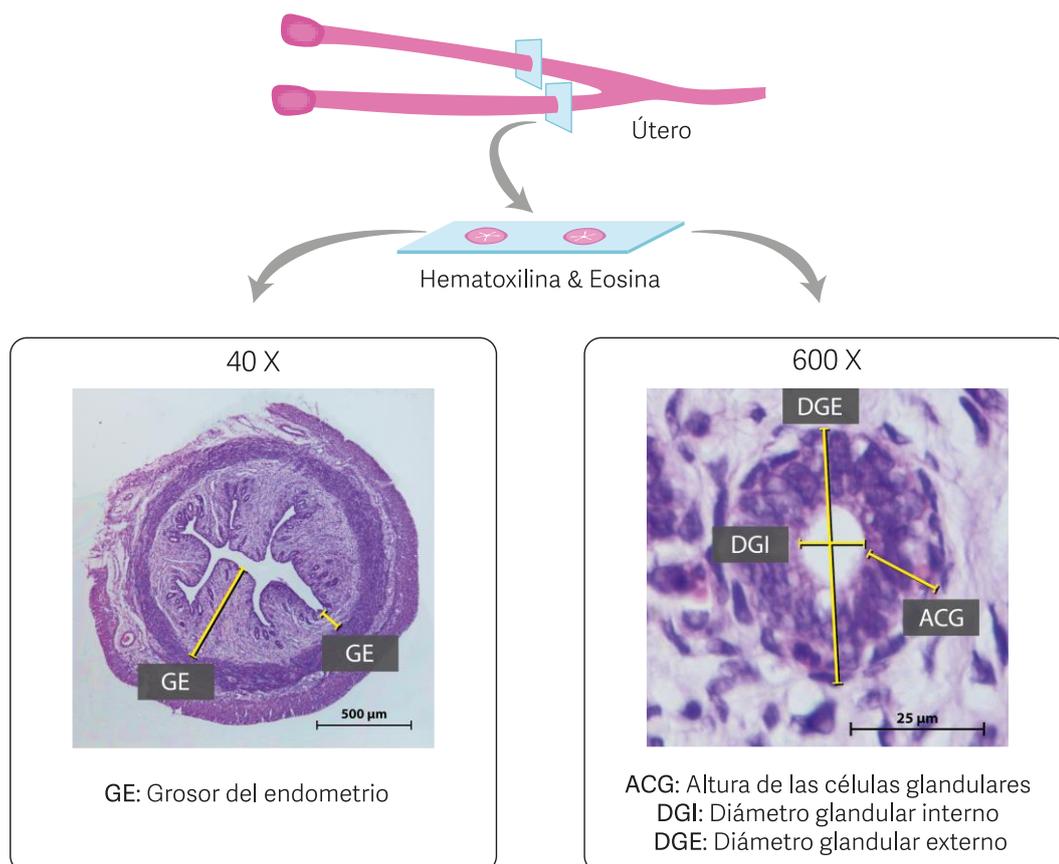


Figura 3.4. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac® (TRT) o solución salina (CON) en gatas sobre la morfometría uterina

### ***Estudio morfométrico ovárico***

Los cortes histológicos de los ovarios fueron evaluados utilizando un microscopio óptico, y en ellos se identificó la etapa de los folículos observados. Asimismo, se determinó el diámetro medio de los ovocitos (DMO) y el diámetro medio folicular (DMF) calculando el promedio del diámetro mínimo y máximo de los ovocitos ( $\mu\text{m}$ ) y de los folículos ováricos ( $\mu\text{m}$ ; Figura 3.5) respectivamente (Carvalho y col., 2016). Las mediciones fueron realizadas mediante el software para análisis de imágenes Image J 1.53t (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

En el caso de los folículos primordiales (FP), folículos primarios unilaminares (FPU) y folículos primarios multilaminares (FPM) se examinaron 10 folículos de cada etapa del desarrollo folicular utilizando 400X (5 folículos de cada etapa de desarrollo por cada ovario), y se determinó el diámetro medio del ovocito (DMO) calculando el promedio entre el diámetro mínimo del ovocito (DMINO) y el diámetro máximo del ovocito (DMAXO). Asimismo, se calculó el diámetro medio folicular (DMF) calculando el promedio entre el diámetro mínimo del folículo (DMINF) y el diámetro máximo del folículo (DMAXF). En el caso de los folículos secundarios (FS) y preovulatorios se examinaron 5 folículos de cada etapa del desarrollo folicular en ambos ovarios, utilizando 100X y en ellos se registró el DMINO, DMAXO, DMINF, DMAXF, para posteriormente calcular el DMO y DMF.

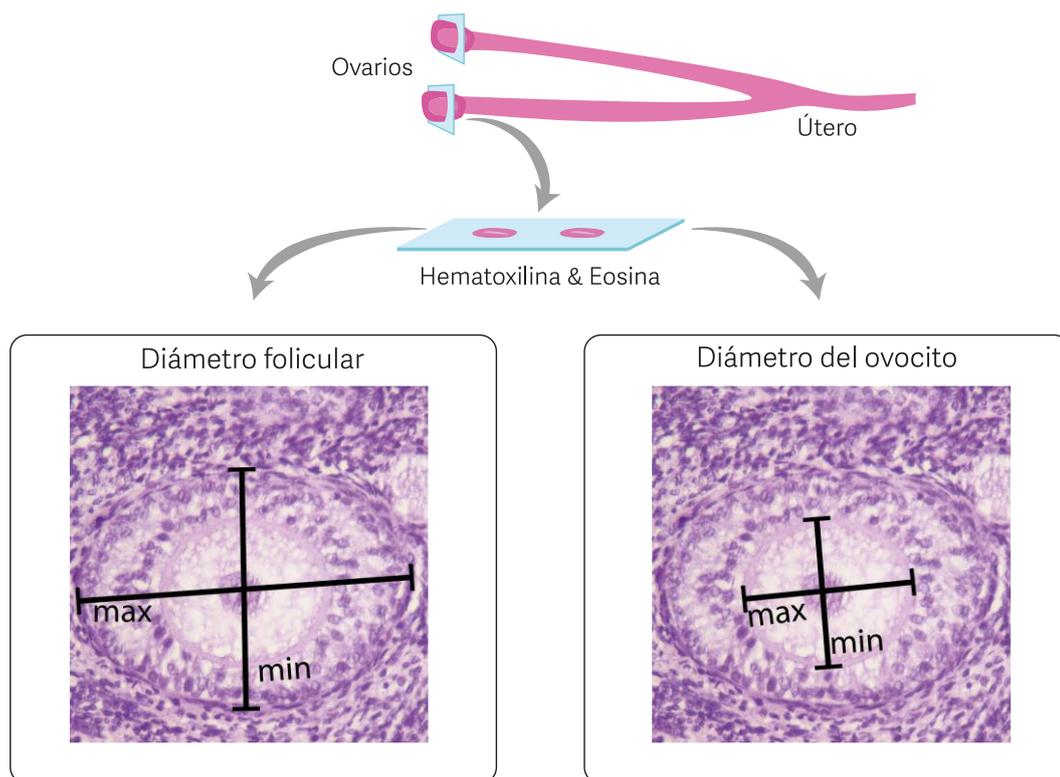


Figura 3.5. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac® (TRT) o solución salina (CON) en gatas sobre la morfometría ovárica

### ***Criterios de inclusión***

Este experimento se realizó respetando los mismos criterios descritos en el Capítulo II.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con mediciones repetidas en el tiempo en el que la unidad experimental fue la gata. Se estableció un nivel de significancia de  $P < 0,05$ . Los datos fueron presentados como cuadrados mínimos  $\pm$  error estándar. Las variables se analizaron con GLIMMIX SAS® 9.4 (SAS, 2003).

## MARCO BIOÉTICO

Este experimento se realizó respetando los mismos criterios de inclusión y consideraciones bioéticas que en el Capítulo II.

## RESULTADOS

### Estudio morfométrico uterino

Las gatas del grupo CON presentaron un menor GE en comparación con el grupo TRT ( $386,94 \pm 0,00 \mu\text{m}$  vs.  $715,76 \pm 0,00 \mu\text{m}$ ,  $P < 0,0001$ ; respectivamente).

Al evaluar las características histológicas del endometrio, se observó que todas las gatas del grupo CON presentaron un endometrio normal (EN), en cambio en las gatas del grupo TRT se observó que 5 gatas ( $n = 5/9$ ) presentaron atrofia del endometrio (AE), una gata ( $n = 1/9$ ) presentaba el endometrio normal (EN) y 3 gatas ( $n = 3/9$ ) presentaron hiperplasia del endometrio (HE; Figura 3.6). Asimismo, en el grupo TRT se observó que 4 ( $n = 4/9$ ) gatas presentaron dilataciones quísticas en el endometrio (Figura 3.6).

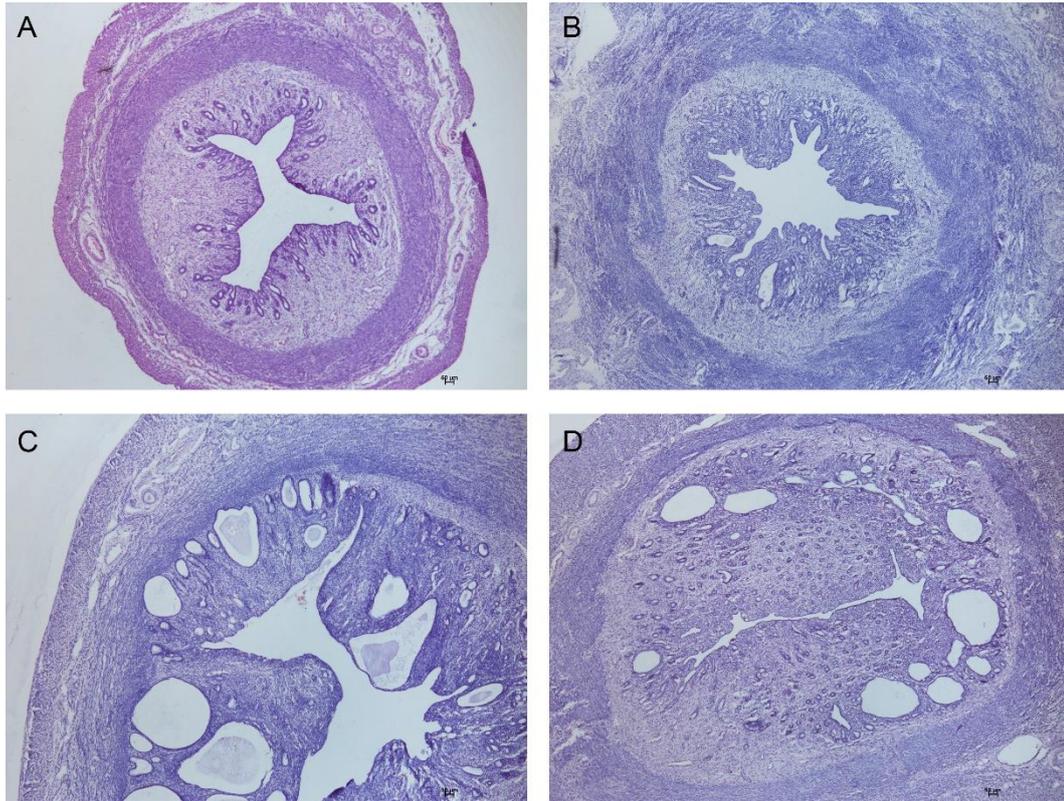


Figura 3.6. Cortes transversales de úteros teñidos con hematoxilina y eosina a 40X. A: útero del grupo CON con endometrio normal, B: útero del grupo TRT con endometrio normal, C: útero del grupo TRT con atrofia del endometrio, D: útero con hipertrofia del endometrio

Al evaluar el GE según el día de la ovariectomía (Figura 3.7) observamos un incremento ( $P < 0,0074$ ) en el grosor endometrial al D120 en las gatas TRT en comparación con el grupo CON (D90).

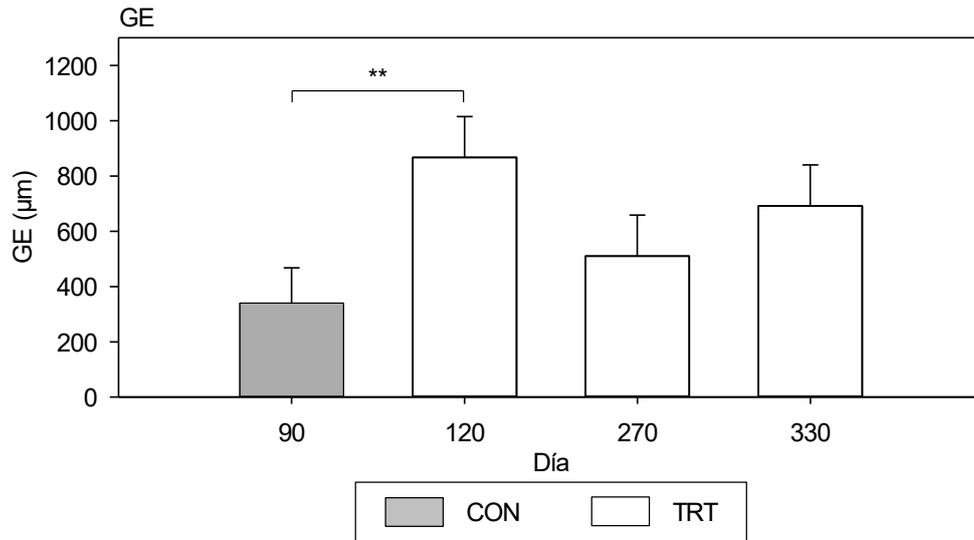


Figura 3.7. Grosor endometrial ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según el día de la ovariectomía. Los asteriscos conectados con líneas indican los niveles de significación, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Al analizar el GE según las características del endometrio se observó que las gatas del grupo CON con EN tuvieron el GE significativamente inferior al

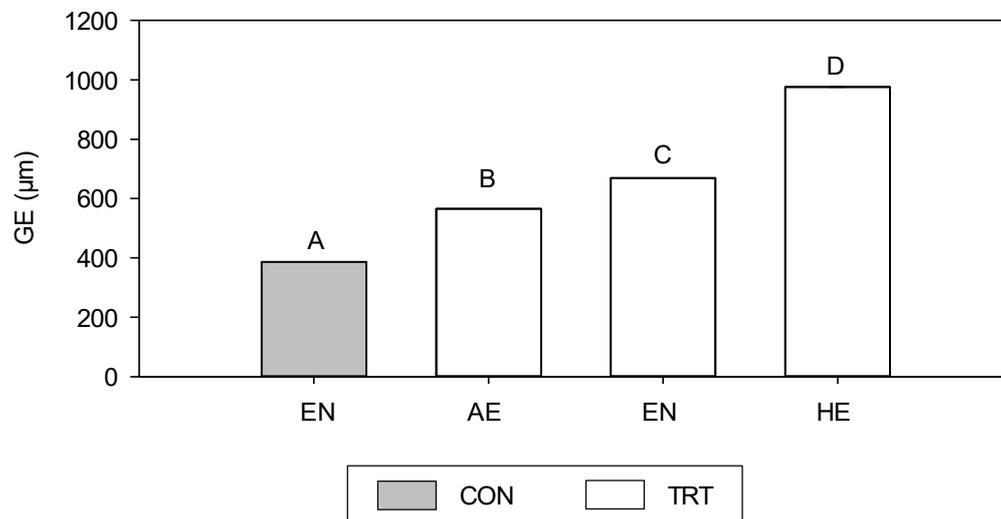


Figura 3.8. Grosor endometrial ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según las características histológicas del endometrio. AE: Atrofia del endometrio, EN: Endometrio normal, HE: Hiperplasia del endometrio. Superíndices difieren a  $P < 0,0001$

En relación con la ACG ( $\mu\text{m}$ ) se observó que las gatas del grupo CON presentaron una mayor altura en comparación con el grupo TRT ( $9,76 \pm 0,01$  vs.  $7,16 \pm 0,01$ ,  $P < 0,0001$ ; respectivamente).

Al comparar la ACG según el día de la cirugía se observó una disminución ( $P < 0,001$ ) de la ACG de las gatas TRT al D270 en comparación con las gatas CON (D90). Posteriormente en el grupo TRT se observó que la ACG al D330 incrementó ( $P < 0,02$ ) su altura en comparación con el D270.

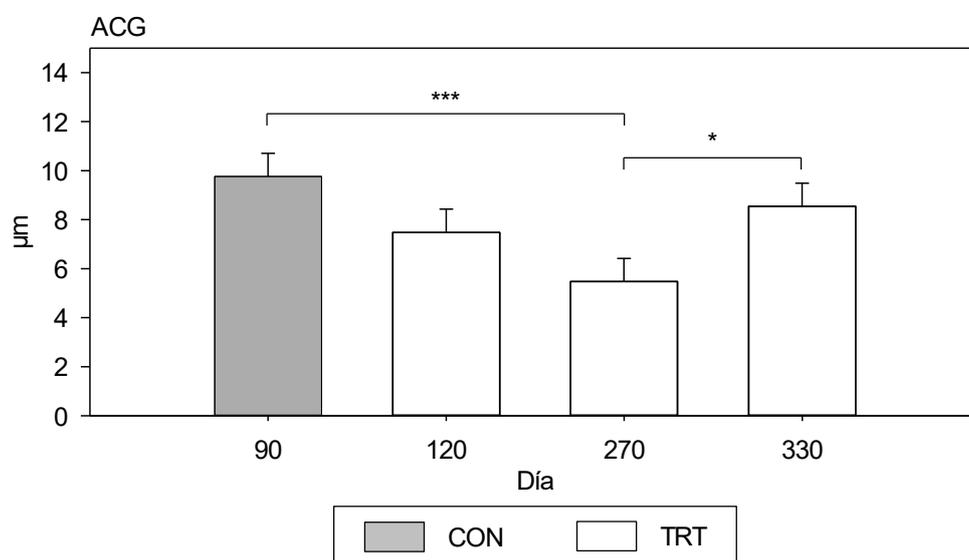


Figura 3.9. ACG ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según el día de la ovariectomía. Los asteriscos conectados con líneas indican los niveles de significación, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Al analizar la ACG según las características del endometrio se observó que las gatas TRT con AE, EN e HE tuvieron una disminución significativa de la ACG en comparación con las gatas del grupo CON con EN ( $P < 0,0001$ ; Figura 3.10)

Asimismo, se observó que las gatas TRT con AE y EN tuvieron una ACG significativamente inferior al de las gatas TRT con HE ( $P < 0,0001$ ). Por el

contrario, no se observaron diferencias significativas entre las gatas TRT con AE

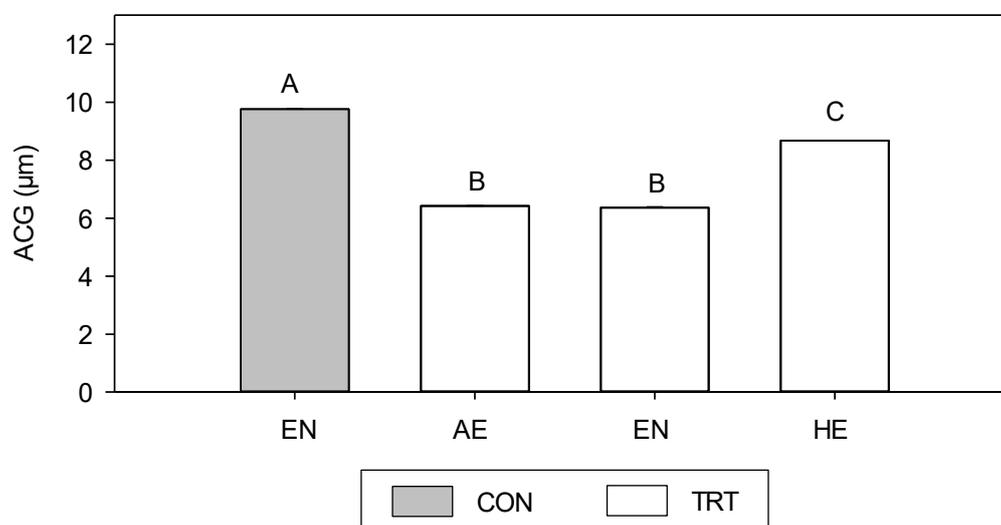


Figura 3.10. Altura celular glandular ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según las características histológicas del endometrio. AE: Atrofia del endometrio, EN: Endometrio normal, HE: Hiperplasia del endometrio. Superíndices difieren a  $P < 0,0001$

En relación con el DGI ( $\mu\text{m}$ ) se observó un incremento del diámetro en las gatas del grupo TRT en comparación con el grupo CON ( $20,59 \pm 0,01$  vs.  $13,21 \pm 0,02$ ,  $P < 0,0001$ , respectivamente). De igual forma con el DGE ( $\mu\text{m}$ ) se observó que las gatas del grupo TRT mostraron un incremento en comparación con el grupo CON ( $39,18 \pm 0,00$  vs.  $35,55 \pm 0,01$ ,  $P < 0,0001$ , respectivamente).

Al analizar el DGI y DGE según el día de la ovariectomía se observó un incremento en el DGI de gatas TRT al D120 en comparación con el grupo CON (D90). Por el contrario, no se observaron diferencias en el DGE según el día de la ovariectomía.

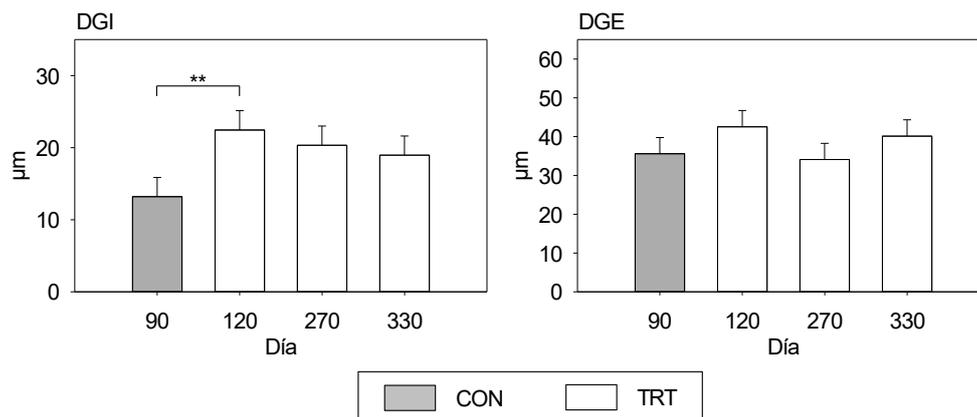


Figura 3.11. DGI y DGE ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según el día de la ovariectomía. Los asteriscos conectados con líneas indican los niveles de significación, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Al analizar el DGI según las características histológicas del útero se observó que las gatas del grupo CON con EN tuvieron un DGI inferior al observado en los grupos TRT con AE, EN e HE ( $P < 0,0001$ , Figura 3.12). Asimismo, se observó que las gatas TRT con AE tuvieron un DGI inferior al de las gatas TRT con HE ( $P < 0,0003$ ).

En cuanto al DGE según las características histológicas del útero se observó que las gatas del grupo CON tuvieron un DGE inferior a lo observado en el grupo TRT con HE ( $P < 0,0001$ ). Asimismo, las gatas de los grupos TRT con AE y con EN tuvieron un DGE inferior al observado en las gatas TRT con HE ( $P < 0,0001$ , Figura 3.12).

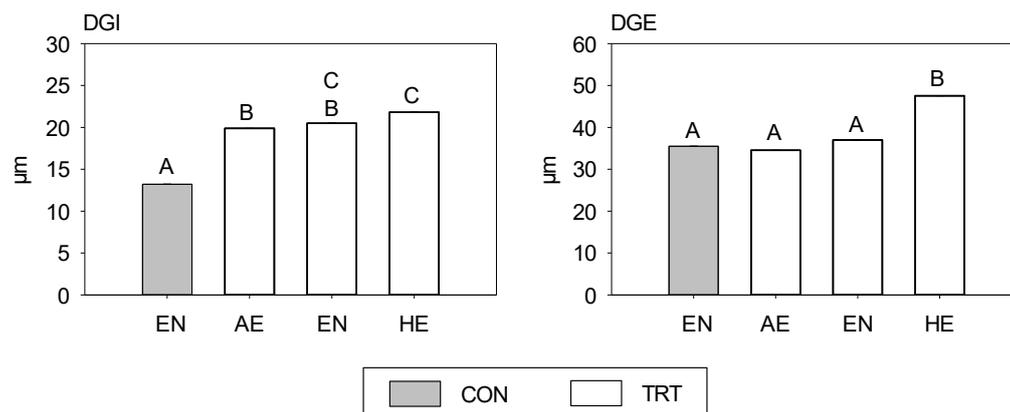


Figura 3.12. Cuadrados medios mínimos  $\pm$  error estándar del diámetro interno y externo de las glándulas endometriales ( $\mu\text{m}$ ) de las gatas CON y TRT según las características histológicas del endometrio. AE: Atrofia del endometrio, EN: Endometrio normal, HE: Hiperplasia del endometrio. Superíndices difieren a  $P < 0,0001$

### Estudio morfométrico ovárico

Durante la evaluación histológica de los ovarios se observó que 5 ( $n=5/9$ ) gatas TRT presentaron quistes foliculares (Figura 3.13). Al evaluar el diámetro medio de los ovocitos se observó que los ovocitos presentes en los FP, FPU y FPM del grupo TRT tuvieron un incremento significativo en sus dimensiones en comparación con los ovocitos del grupo CON (Figura 3.14). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el diámetro de los ovocitos de los FS entre el grupo CON y TRT (Figura 3.14).

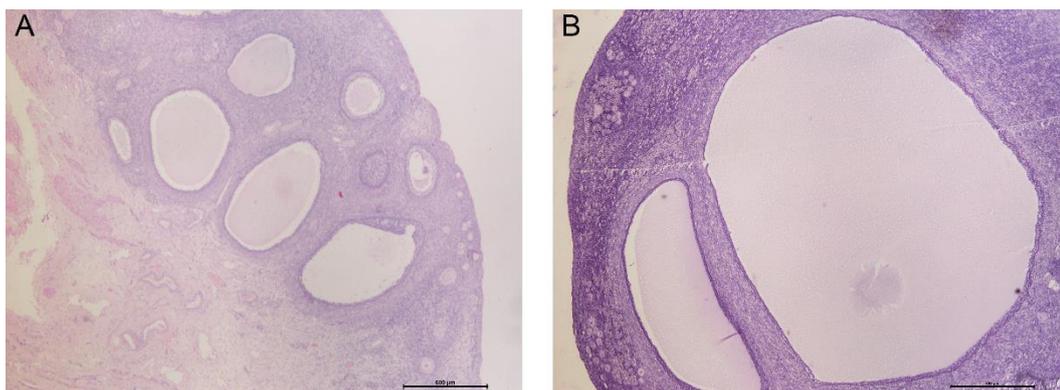


Figura 3.13. Cortes histológicos de ovarios de gatas teñidos con hematoxilina y eosina a 40X. A: ovario del grupo CON en el cual se observan folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo, B: ovario del grupo TRT en el cual se observa la presencia de quistes foliculares.

Asimismo, los FP, FPU y FPM de grupo TRT tuvieron un incremento significativo en sus dimensiones en comparación con los folículos ováricos del grupo CON (Figura 3.14). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el diámetro de los ovocitos de los FS entre el grupo CON y TRT (Figura 3.14).

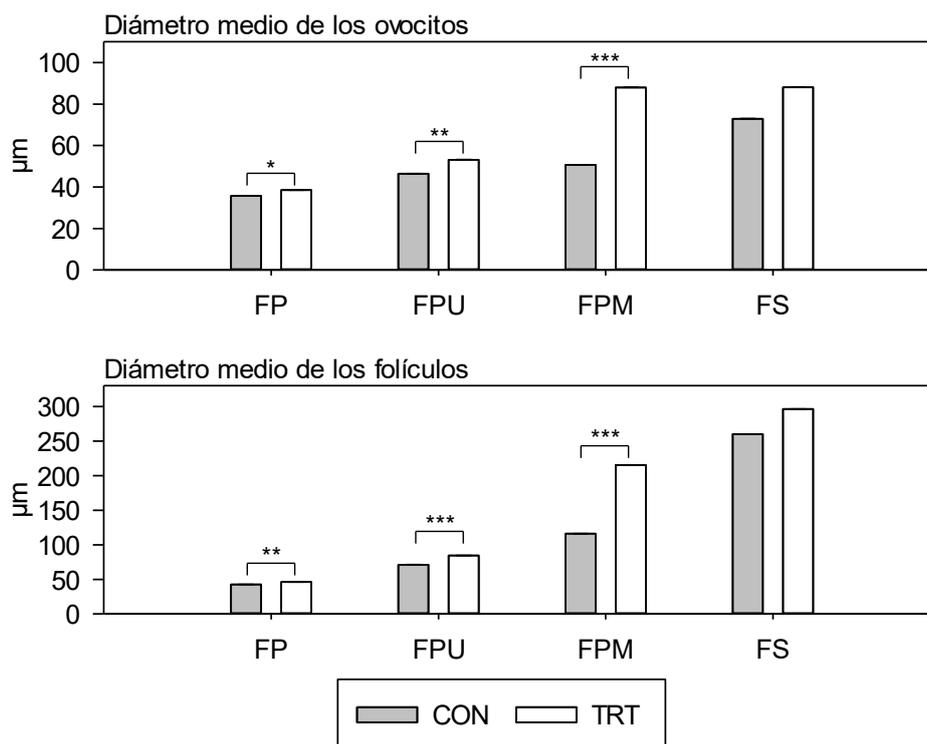


Figura 3.14. Cuadrados medios mínimos  $\pm$  error estándar del diámetro medio de los ovocitos y folículos ( $\mu\text{m}$ ) en los grupos CON y TRT. Los asteriscos conectados con líneas indican los niveles de significación, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ . FP: folículos primordiales, FPU: folículos primarios unilaminares, FPM: folículos primordiales multilaminares, FS: folículos secundarios

Al evaluar el diámetro medio de los folículos ováricos según el día de la cirugía (Figura 3.15) se observó que los FP de las gatas TRT tuvieron un incremento ( $P < 0,04$ ) en las dimensiones el D120 en comparación con el grupo CON. Por el contrario, no se observaron diferencias en el diámetro de los FPU y FPM según el día de la cirugía.

Con respecto a las dimensiones de los ovocitos según el día de la ovariectomía se observó que no existió diferencia en las dimensiones de los ovocitos presentes en los FP y FPU al comparar CON vs. TRT. Por el contrario, se observó que el D330 los ovocitos de los FPM tuvieron un incremento significativo ( $P < 0,02$ ) en su dimensión en comparación con el grupo CON (D90).

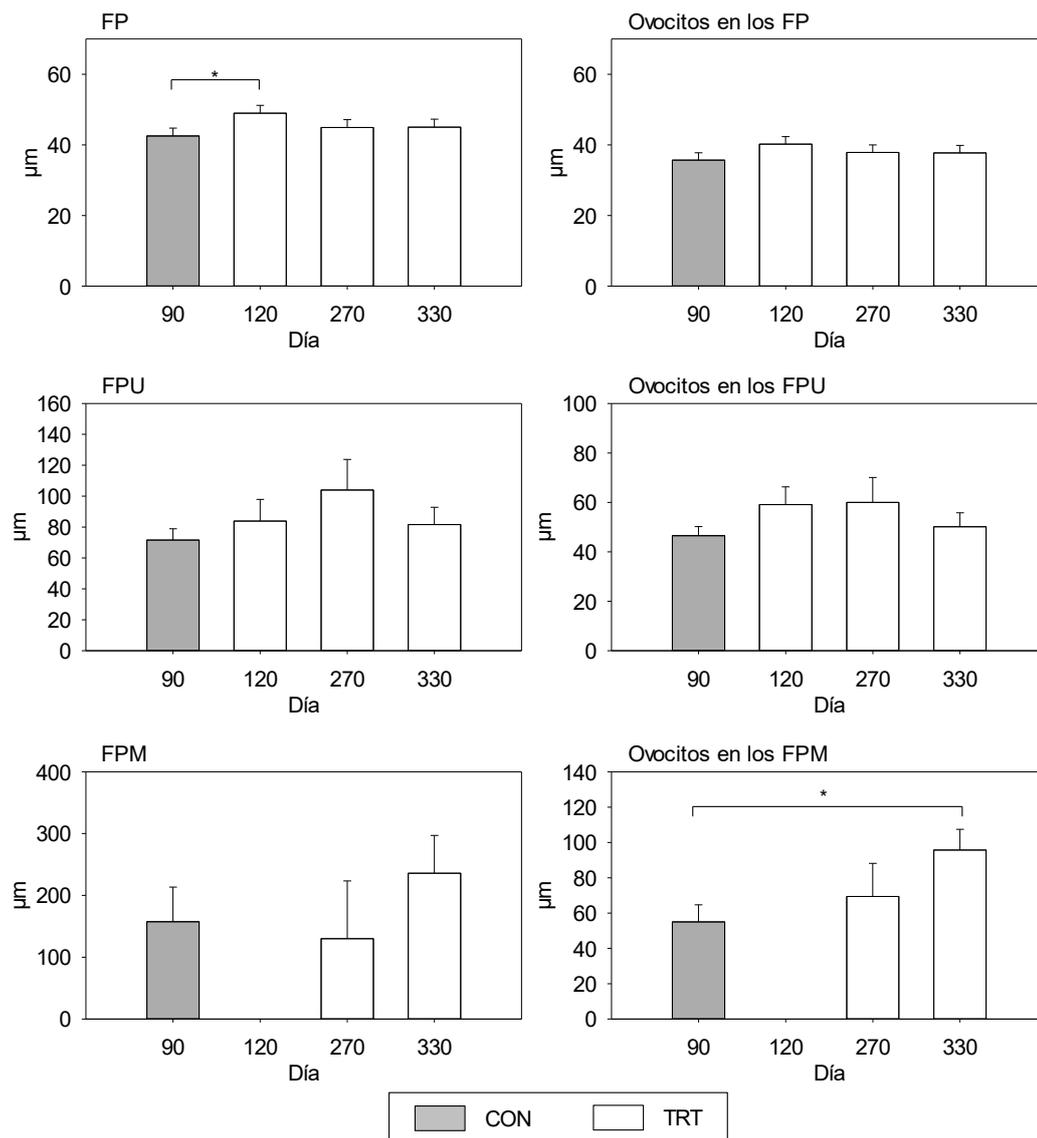


Figura 3.15. Cuadrados medios mínimos  $\pm$  error estándar del diámetro medio de los ovocitos y folículos ( $\mu\text{m}$ ) en los grupos CON y TRT según el día de la ovariectomía. Los asteriscos conectados con líneas indican los niveles de significación, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ . FP: folículos primordiales, FPU: folículos primarios unilaminares, FPM: folículos primordiales multilaminares, FS: folículos secundarios

Al evaluar el diámetro medio de los ovocitos (DMO) de los FP se observó que los ovocitos del grupo TRT con AE tuvieron un incremento significativo (Figura 3.16) en su diámetro en comparación con los ovocitos del grupo CON. Asimismo, los ovocitos presentes en los FPU con AE e HE tuvieron un

incremento significativo en su diámetro en comparación con el grupo CON (Figura 3.16).

En cuanto a los FPM se observó que los ovocitos del grupo TRT con AE e HE tuvieron un diámetro significativamente superior (Figura 3.16) en comparación con el grupo CON. Asimismo, los ovocitos presentes en los FMP del grupo TRT con HE tuvieron un diámetro significativo superior (Figura 3.16) en comparación con los ovocitos del grupo TRT con AE. No se observaron diferencias significativas en el diámetro de los ovocitos de los FS del grupo CON en comparación con el grupo TRT.

En relación con el diámetro medio folicular (DMF) se observó que los FP del grupo TRT con AE, EN e HE tuvieron un incremento significativo en sus dimensiones en comparación con los FP del grupo CON (Figura 3.16). Asimismo, los FPU del grupo TRT con AE e HE tuvieron un incremento significativo (Figura 3.16) en sus dimensiones en comparación con el grupo CON. Asimismo, los FPU del grupo TRT con AE e HE tuvieron un tamaño significativamente superior (Figura 3.16) en comparación con los FPM de las gatas con EN.

Asimismo, los FPM del grupo TRT con AE e HE tuvieron un incremento significativo (Figura 3.16) en su diámetro en comparación con el grupo CON. No se observaron diferencias significativas en el diámetro de los FS del grupo CON en comparación con el grupo TRT.

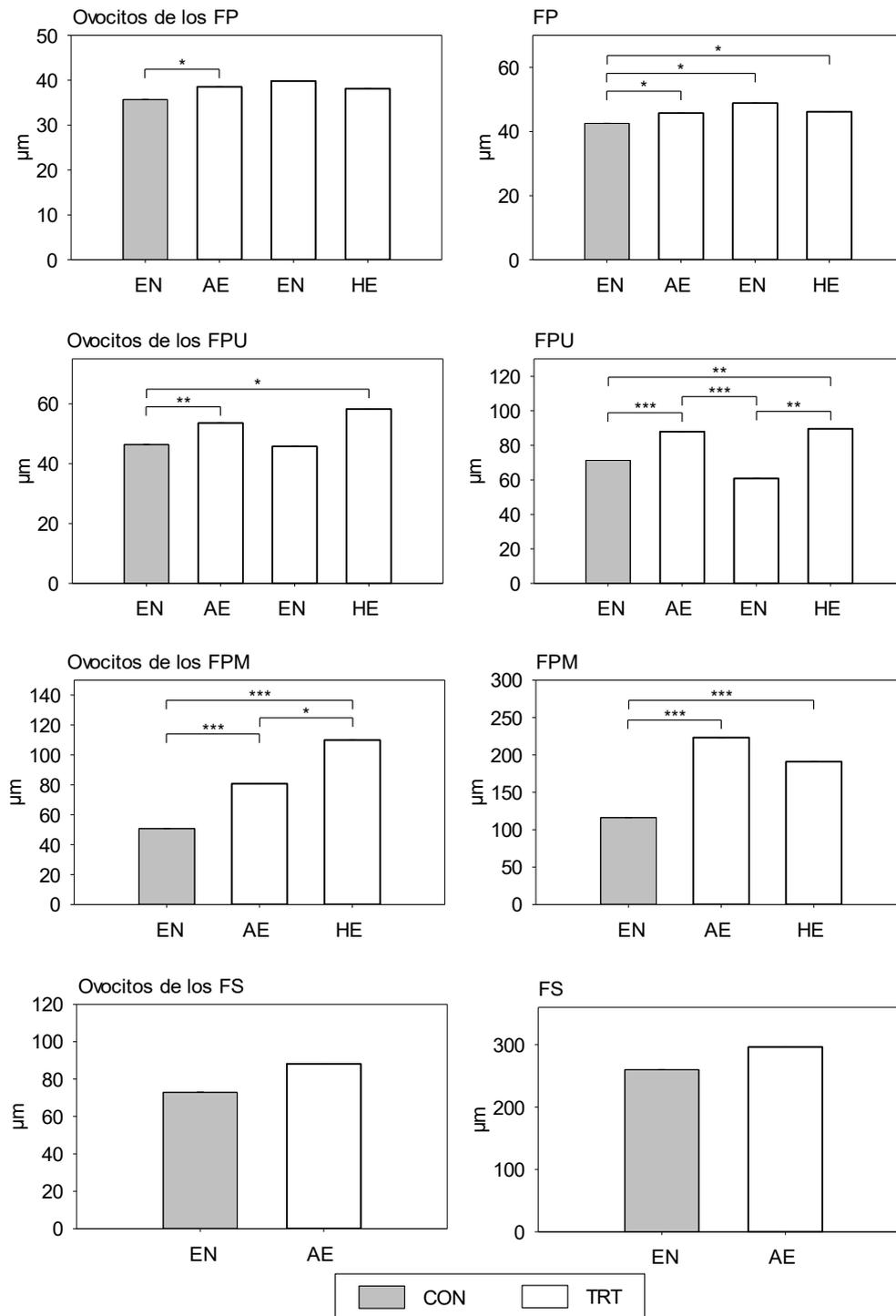


Figura 3.16. Cuadrados medios mínimos  $\pm$  error estándar del diámetro de los ovocitos y folículos en las diferentes etapas de desarrollo folicular. Los asteriscos conectados con líneas indican los niveles de significación, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ . FP: folículos primordiales, FPU: folículos primarios unilaminares, FPM: folículos primordiales multilaminares, FS: folículos secundarios, EN: endometrio normal, AE: atrofia del endometrio, HE: hiperplasia del endometrio

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los resultados obtenidos pudimos observar que las gatas TRT tuvieron un GE superior al de las gatas CON. Nuestros hallazgos difieren con lo observado al utilizar una vacuna anti análogo de la GnRH (alarelina) en ovejas y conejas, en las cuales existió una disminución en el grosor de la pared uterina en los grupos tratados (Wei y col., 2014, 2011). Asimismo nuestros resultados difieren con lo observado en ratas al utilizar una vacuna anti-GnRH en las cuales se produjo atrofia del endometrio (Okon y col., 1980). También se han observado alteraciones del GE con otros métodos contraceptivos, es así que en gatas la utilización de un análogo de la GnRH (deslorelina) ocasionó que las gatas tratadas presentaran atrofia del endometrio (Toydemir y col., 2012).

En nuestro estudio el incremento del GE en las gatas TRT podría explicarse por el incremento observado en el diámetro de las glándulas endometriales y por las dilataciones quísticas que se observaron en algunas de las gatas TRT. Las dilataciones quísticas de las glándulas endometriales también se han observado en ratas tras la aplicación de una vacuna anti-GnRH (Okon y col., 1980). Estas dilataciones quísticas podrían ser ocasionadas por una obstrucción de las glándulas endometriales producto de un desbalance hormonal o de una deficiente actividad secretora de las glándulas endometriales (Williams y col., 2007; Yamaguchi y col., 2021), lo cual concuerda con la disminución observada en la ACG de las gatas TRT lo cual estaría asociado a una alteración en la secreción de las glándulas endometriales.

En nuestro estudio el GE de las gatas del grupo CON fue superior al que se observa durante el interestro (Muphung y col., 2009), incluso las dimensiones del GE concuerdan con lo observado previamente en las dimensiones del útero durante la fase lútea (Chatdarong y col., 2005). Lo que indicaría que las gatas del grupo CON continuaron ciclando durante el estudio.

En nuestro estudio observamos que la ACG fue mayor en el grupo CON en comparación con el grupo TRT. Esto nos indicaría que las gatas TRT no estuvieron expuestas a un estímulo folicular o lúteo, ya que se ha observado que en las gatas la ACG incrementa considerablemente frente al estímulo de los  $E_2$  y la  $P_4$  (Boomsma y col., 1997; Chatdarong y col., 2005; Kutzler, 2022).

En relación con el diámetro de las glándulas endometriales, en nuestro estudio las gatas del grupo TRT presentaron unos DGI y DGE superiores a la observado en el grupo CON. Estos resultados difieren de lo observado por Mitjana y col., (2020) quienes en cerdas vacunadas con Improvac<sup>®</sup> encontraron que las glándulas endometriales fueron más pequeñas en comparación con el grupo control. Asimismo, nuestros resultados difieren con lo observado tras la aplicación de la vacuna GonaCon<sup>™</sup> en gatas, en las cuales no se observaron alteraciones morfológicas de las glándulas endometriales tras la vacunación (Novak y col., 2021).

Con respecto a las características histológicas de los ovarios, los quistes foliculares que se observaron en las gatas TRT son similares a lo observado en ratas al utilizar una vacuna anti GnRH (Fraser y Baker, 1978; Okon y col., 1980) y estos hallazgos podrían ser ocasionadas por la inadecuada producción de gonadotropinas producto de la vacunación lo cual impediría la correcta

maduración, ovulación y luteinización de los folículos (MacLachlan, 1987; Okon y col., 1980).

En nuestro estudio pudimos observar que los FP, FPU y FPM junto con sus ovocitos fueron significativamente más grandes en el grupo TRT en comparación con el grupo CON. Además las dimensiones de los FP, FPU y FPM junto con los ovocitos presentes en los FPU y FPM fueron superiores a las dimensiones reportadas en gatas adultas (Carvalho y col., 2016). Nuestros resultados son similares a lo observado por Wei y col., (2011) quienes observaron que en conejas tras la aplicación de una vacuna anti un análogo de la GnRH (alarelina) existió un incremento del diámetro de los folículos primarios y es así que los autores concluyeron que la inmunización mejoró el desarrollo de los folículos.

## CONCLUSIONES

Podemos concluir que la aplicación de dos dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> en gatas ocasiona un incremento del GE y en algunos casos puede llegar a producir AE o HE. Asimismo, su utilización disminuye la altura de las células glandulares lo que demuestra la falta de efecto de los E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> sobre estas células.

Asimismo, la vacunación tiene efecto sobre los ovocitos de los FP, FPU y FPM y sobre los FP, FPU, FPM en los cuales ocasiona un incremento en sus dimensiones. Por el contrario, no altera las dimensiones de los ovocitos de los FS y sobre los FS, lo cual sugiere que su efecto es potencialmente reversible manteniendo el potencial reproductivo de las gatas.

## CONCLUSIONES GENERALES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis se puede concluir que en gatas la aplicación de 2 dosis de la vacuna Improvac<sup>®</sup> suprime la ocurrencia del estro por al menos entre 120 a 330 días. Entre el tiempo de aplicación de la primera dosis de la vacuna y el inicio del efecto contraceptivo de la vacuna es posible que algunas gatas vuelvan a ciclar, sin embargo debe evaluarse la fertilidad de este ciclo pos vacunal para determinar si es preciso realizar algún control sobre el mismo. Es posible que la funcionalidad de cuerpo lúteo esté comprometida en estos casos y que la hembra no pueda mantener la gestación tal como ocurre con los implantes de agonistas-antagonistas GnRH como la deslorelina.

La fiebre que se observó en algunas gatas tras la vacunación fue de corta duración, asimismo las masas que se formaron en el sitio de aplicación de la vacuna disminuyeron su tamaño a medida que pasó el tiempo y estas masas no afectaron el comportamiento normal de las gatas. Asimismo, la vacuna no ocasionó cambios en los parámetros clínicos, hematológicos y bioquímicos, lo que demuestra la inocuidad de la vacuna.

Los estudios evidenciaron que la vacuna puede ocasionar cambios en la estructura histológica del endometrio, así como también alteraciones en el desarrollo de los ovocitos y de los folículos ováricos. Por el contrario, la morfometría de los ovocitos primordiales no se vio afectada, lo cual indicaría que la vacunación mantendría el potencial reproductivo de las gatas. Por lo cual esta vacuna muestra ser una alternativa prometedora para el control reproductivo en las

gatas. Futuros estudios podrán estimar la duración total del efecto de la vacuna y la fertilidad de los celos pos vacunales

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aeluro S, Kavanagh TJ. Domestic cats as environmental lead sentinels in low-income populations: a One Health pilot study sampling the fur of animals presented to a high-volume spay/neuter clinic. Environ Sci Pollut Res. 2021; 28: 57925-57938.
2. Ahn HS, Park BJ, Go HJ, Lyoo EL, Kim DH, Lee JB, Park SY, Song CS, Lee SW, Choi YK, Jung HJ, Kim HM, Choi IS. Induction of immunocontraceptive effects in both male and female mice immunized with GnRH vaccine. Vet Med Sci. 2021; 7: 1999-2007.
3. Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, Lam WS, Broekmans FJ. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. Cochrane Libr. 2016; CD001750.
4. Asa CS. Contraception in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2018; 48: 733-742.
5. Baldwin CJ, Peter AT, Bosu WTK, Dubielzig RR. The contraceptive effects of levonorgestrel in the domestic cat. Lab Anim Sci. 1994; 44: 261-269.
6. Benavides Valades G, Ganswindt A, Annandale H, Schulman ML, Bertschinger HJ. Non-invasive assessment of the reproductive cycle in free-ranging female African elephants (*Loxodonta africana*) treated with a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine for inducing anoestrus. Reprod Biol Endocrinol. 2012; 10: 63.
7. Bissonnette V, Lussier B, Doizé B, Arsénault J. Impact of a trap-neuter-return event on the size of free-roaming cat colonies around barns and

- stables in Quebec: A randomized controlled trial. Can J Vet Res. 2018; 82: 192-197.
8. Boomsma RA, Mavrogianis PA, Verhage HG. Immunocytochemical localization of transforming growth factor  $\alpha$ , epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in the cat endometrium and placenta. Histochem J. 1997; 29: 495-504.
  9. Botha AE, Schulman ML, Bertschinger HJ, Guthrie AJ, Annandale CH, Hughes SB. The use of a GnRH vaccine to suppress mare ovarian activity in a large group of mares under field conditions. Wildl Res. 2008; 35: 548-554.
  10. Bristol-Gould S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology. 2006; 66: 5-13.
  11. Buckmaster T, Dickman CR, Johnston MJ. Assessing risks to non-target species during poison baiting programs for feral cats. PLoS ONE. 2014; 9: e107788.
  12. Burke TJ. Pharmacologic control of estrus in the bitch and queen. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1982; 12: 79-84.
  13. Burke TJ. Feline reproduction. Vet Clin North Am. 1976; 6: 317-331.
  14. Burke TJ. Fertility control in the cat. Vet Clin North Am. 1977; 7: 699-703.
  15. Candela MG, Fanelli A, Carvalho J, Serrano E, Domenech G, Alonso F, Martínez-Carrasco C. Urban landscape and infection risk in free-roaming cats. Zoonoses Public Health. 2022; 69: 295-311.
  16. Carrasco Sangache WF, García Mitacek MC, Stornelli MA. Métodos contraceptivos en gatas: pasado, presente y futuro. Analecta Vet. 2022; 42: 065.

17. Carvalho IR de, Denadai DS, Trevisan JT, Mendes HMF, Perri SHV, Monteiro CMR, Ferreira JZ, Feliciano MAR, Pierucci JC, Vicente WRR, Koivisto MB de. Follicular histomorphometry and evaluation of ovarian apoptosis in queens of different age groups. Acta Sci Vet. 2016; 44: 1-8.
18. Chatdarong K, Rungsipipat A, Axnér E, Linde Forsberg C. Hystero-graphic appearance and uterine histology at different stages of the reproductive cycle and after progestagen treatment in the domestic cat. Theriogenology. 2005; 64: 12-29.
19. Chiappe Barbará A. Bases fisiológicas de la reproducción en la hembra. En: García Sacristán A. Fisiología veterinaria. Madrid, Editorial Tébar Flores, 2018, p. 961-977.
20. Cho Y, Park BJ, Hwang BR, Lee YA, Choi IS, Han JS. Effectiveness of *Escherichia coli*-expressed STF2-GnRH as an immunocontraceptive vaccine in female cats. Journal of the Preventive Veterinary Medicine. 2022; 46: 9-15.
21. CIOMS, ICLAS. International guiding principles for biomedical research involving animals. 2012.
22. Colton MW. Progestational agents in pet practice, indications, agents and doses, precautions. Mod Vet Pract. 1965; 1965: 53-56.
23. Conn PM, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. N Engl J Med. 1991; 324: 93-103.
24. da Silva TFP, da Silva LDM, Uchoa DC, Monteiro CLB, Thomaz L de A. Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod. Theriogenology. 2006; 66: 1476-1481.

25. Dalmau A, Velarde A, Rodríguez P, Pedernera C, Llonch P, Fàbrega E, Casal N, Mainau E, Gispert M, King V, Sloomans N, Thomas A, Mombarg M. Use of an anti-GnRF vaccine to suppress estrus in crossbred Iberian female pigs. Theriogenology. 2015; 84: 342-347.
26. Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. Top Companion Anim Med. 2009; 24: 55-63.
27. Davidson AP, Stabenfeldt GH. The estrous/menstrual cycle. En: Klein BG. Cunningham's textbook of veterinary physiology. St. Louis, Missouri, Elsevier, 2020a, p. 442-449.
28. Davidson AP, Stabenfeldt GH. Reproductive system development and sexual differentiation. En: Klein BG. Cunningham's textbook of veterinary physiology. St. Louis, Missouri, Elsevier, 2020b, p. 428-435.
29. Doherty TS, Dickman CR, Johnson CN, Legge SM, Ritchie EG, Woinarski JCZ. Impacts and management of feral cats *Felis catus* in Australia. Mam Rev. 2017; 47: 83-97.
30. Donovan CE, Hazzard T, Schmidt A, LeMieux J, Hathaway F, Kutzler MA. Effects of a commercial canine gonadotropin releasing hormone vaccine on estrus suppression and estrous behavior in mares. Anim Reprod Sci. 2013; 142: 42-47.
31. Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long KA, Lopaticki S, Nugent EA, Simons JA, Walker J, Hennessy DP. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. J Anim Sci. 2001; 79: 2524-2535.

32. Eade JA, Roberston ID, James CM. Contraceptive potential of porcine and feline zona pellucida A, B and C subunits in domestic cats. Reproduction. 2009; 137: 913-922.
33. Elhay M, Newbold A, Britton A, Turley P, Dowsett K, Walker J. Suppression of behavioural and physiological oestrus in the mare by vaccination against GnRH. Aust Vet J. 2007; 85: 39-45.
34. England GCW. Physiology and endocrinology of the female. En: England GCW, von Heimendahl A. BSAVA Manual of canine and feline reproduction and neonatology. 2da. Edición. Gloucester, UK, British Small Animal Veterinary Association, 2010, p. 1-12.
35. Faruck MO, Koirala P, Yang J, D'Occhio MJ, Skwarczynski M, Toth I. Polyacrylate-GnRH peptide conjugate as an oral contraceptive vaccine candidate. Pharmaceutics. 2021; 13: 1081.
36. Faya M, Carranza A, Priotto M, Graiff D, Zurbriggen G, Diaz JD, Gobello C. Long-term melatonin treatment prolongs interestrus, but does not delay puberty, in domestic cats. Theriogenology. 2011; 75: 1750-1754.
37. Feldman EC, Nelson RW. Feline reproduction. En: Feldman EC, Nelson RW. Canine and Feline Endocrinology. 3ra. Edición. St. Louis, Missouri, Saunders, 2004, p. 1016-1045.
38. Findik M, Maral NE, Aslan S. The use of proligestone, megestrol acetate and GnRH on queens with the aim of hormonal contraception. Turk J Vet Anim Sci. 1999; 23: 455-459.
39. Fischer A, Benka VA, Briggs JR, Driancourt M-A, Maki J, Mora DS, Morris KN, Myers KA, Rhodes L, Vansandt LM, Weedon GR, Wolf J,

- Levy JK. Effectiveness of GonaCon as an immunocontraceptive in colony-housed cats. J Feline Med Surg. 2018; 20: 786-792.
40. Fraser HM, Baker TG. Changes in the ovaries of rats after immunization against luteinizing hormone releasing hormone. J Endocrinol. 1978; 77: 85-93.
41. Furthner E, Roos J, Niewiadomska Z, Maenhoudt C, Fontbonne A. Contraceptive implants used by cat breeders in France: a study of 140 purebred cats. J Feline Med Surg. 2020; 22: 984-992.
42. García Mitacek MC. Ciclo estral felino. En: Stornelli MA, De la Sota RL. Manual de reproducción de animales de producción y compañía. La Plata, Edulp, 2016a, p. 70-76.
43. García Mitacek MC. Inducción de ciclos estrales en la gata. En: Stornelli MA, De la Sota RL. Manual de reproducción de animales de producción y compañía. La Plata, Edulp, 2016b, p. 398-402.
44. Gatel L, Rault DN, Chalvet-Monfray K, De Rooster H, Levy X, Chiers K, Saunders JH. Ultrasonography of the normal reproductive tract of the female domestic cat. Theriogenology. 2020; 142: 328-337.
45. Gerber HA, Jöchle W, Sulman FG. Control of reproduction and of undesirable social and sexual behaviour in dogs and cats. J Small Anim Pract. 1973; 14: 151-158.
46. Gimenez F, Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Dorna IV, de la Sota RL, Stornelli MA. Suppression of estrus in cats with melatonin implants. Theriogenology. 2009; 72: 493-499.

47. Gobar GM, Kass PH. World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. J Am Vet Med Assoc. 2002; 220: 1477-1482.
48. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Atanasov A, Albouy M, Navarro C, Wehrend A. Treatment of queens in estrus and after estrus with a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin; hormonal response, duration of efficacy, and reversibility. Theriogenology. 2013; 79: 640-646.
49. Gorman SP, Levy JK, Hampton AL, Collante WR, Harris AL, Brown RG. Evaluation of a porcine zona pellucida vaccine for the immunocontraception of domestic kittens (*Felis catus*). Theriogenology. 2002; 58: 135-149.
50. Graham LH, Swanson WF, Wildt DE, Brown JL. Influence of oral melatonin on natural and gonadotropin-induced ovarian function in the domestic cat. Theriogenology. 2004; 61: 1061-1076.
51. Gulyuz F, Tasal I, Uslu BA. Effects of melatonin on the onset of ovarian activity in Turkish Van Cats. J Anim Vet Adv. 2009; 8: 2033-2037.
52. Gupta SK, Toor S, Minhas V, Chaudhary P, Raman M, Anoop S, Panda AK. Contraceptive efficacy of recombinant porcine zona proteins and fusion protein encompassing canine ZP3 fragment and GnRH in female beagle dogs. Am J Reprod Immunol. 2022; 87: e13536.
53. Harris TW, Wolchuk N. The suppression of estrus in the dog and cat with long-term administration of synthetic progestational steroids. Am J Vet Res. 1963; 24: 1003-1006.
54. Hennessy D. IMPROVAC® Mode of action. Parksville Australia, Pfizer Animal Health, 2008.

55. Hunzicker-Dunn M, Mayo K. Gonadotropin signaling in the ovary. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, 2015, p. 895-945.
56. Hurley KF, Levy JK. Rethinking the animal shelter's role in free-roaming cat management. Front Vet Sci. 2022; 9: 847081.
57. Imboden I, Janett F, Burger D, Crowe MA, Hässig M, Thun R. Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. Theriogenology. 2006; 66: 1866-1875.
58. Ivanova M, Petrov M, Klissourska D, Mollova M. Contraceptive potential of porcine zona pellucida in cats. Theriogenology. 1995; 43: 969-981.
59. Jackson EKM. Contraception in the dog and cat. Br Vet J. 1984; 140: 132-137.
60. Janeczko S. Community cats. En: White S. High-quality, high-volume spay and neuter and other shelter surgeries. 1ra. Edición. Wiley, 2020, p. 477-508.
61. Jiang S, Hong M, Su S, Song M, Tian Y, Cui P, Song S, Wang Y, Li F, Fang F. Effect of active immunization against GnRH-I on the reproductive function in cat: Active Immunization against GnRH-I in Cat. Anim Sci J. 2015; 86: 747-754.
62. Jöchle W, Jöchle M. Reproductive and behavioral control in the male and female cat with progestins: Long-term field observations in individual animals. Theriogenology. 1975; 3: 179-185.
63. Johnson AK. Normal feline reproduction: The queen. J Feline Med Surg. 2022; 24: 204-211.

64. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Canine and feline theriogenology. 1ra. Edición. Philadelphia, PA, Saunders, 2001.
65. Junco JA, Fuentes F, Millar RP. A dual kisspeptin-GnRH immunogen for reproductive immunosterilization. Vaccine. 2021; 39: 6437-6448.
66. Kawase K, Tomiyasu J, Ban K, Ono R, Ando S, Ono A, Kimura R, Tomisawa K, Matsui M, Shiihara S. Contraceptive effect of a gonadotropin-releasing hormone vaccine on a captive female African Lion (*Panthera leo*): a case study. J Vet Med Sci. 2021; 83: 1454-1458.
67. Keskin A, Yilmazbas G, Yilmaz R, Ozyigit MO, Gumen A. Pathological abnormalities after long-term administration of medroxyprogesterone acetate in a queen. J Feline Med Surg. 2009; 11: 518-521.
68. Khumsap S, Thitaram C, Somgird C. GnRH vaccine could suppress serum progesterone level in Thai pony mares; A preliminary study. Veterinary Integrative Sciences. 2020; 18: 43-51.
69. Kilgour RJ, Magle SB, Slater M, Christian A, Weiss E, DiTullio M. Estimating free-roaming cat populations and the effects of one year Trap-Neuter-Return management effort in a highly urban area. Urban Ecosyst. 2017; 20: 207-216.
70. Kreisler RE, Cornell HN, Levy JK. Decrease in population and increase in welfare of community cats in a twenty-three year trap-neuter-return program in Key Largo, FL: The ORCAT Program. Front Vet Sci. 2019; 6: 7.
71. Kronfeld DS, Donoghue S, Glickman LT. Body condition of cats. J Nutr. 1994; 124: 2683S-2684S.

72. Kutzler M, Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. Theriogenology. 2006; 66: 514-525.
73. Kutzler MA. Reproductive anatomy and puberty in the queen. En: Johnson A, Kutzler M. Feline Reproduction. GB, CABI, 2022, p. 1-10.
74. Levy JK. Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. Am J Reprod Immunol. 2011; 66: 63-70.
75. Levy JK, Friary JA, Miller LA, Tucker SJ, Fagerstone KA. Long-term fertility control in female cats with GonaCon™, a GnRH immunocontraceptive. Theriogenology. 2011; 76: 1517-1525.
76. Levy JK, Mansour M, Crawford PC, Pohajdak B, Brown RG. Survey of zona pellucida antigens for immunocontraception of cats. Theriogenology. 2005; 63: 1334-1341.
77. Leyva H, Addiego L, Stabenfeldt G. The effect of different photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin, and cortisol in the domestic cat. Endocrinology. 1984; 115: 1729-1736.
78. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. J Reprod Fertil Suppl. 1989; 39: 125-133.
79. Liebich H-G. Female reproductive system (organa genitalia feminina). Veterinary histology of domestic mammals and birds. 5ta. Edición. Sheffield, 5m Publishing, 2019, p. 301-323.
80. Liu Y, Tian Y, Zhao X, Jiang S, Li F, Zhang Y, Zhang X, Li Y, Zhou J, Fang F. Immunization of dogs with recombinant GnRH-1 suppresses the development of reproductive function. Theriogenology. 2015; 83: 314-319.

81. Looper S, Anderson G, Sun Y, Shukla A, Lasley B. Efficacy of levonorgestrel when administered as an irradiated, slow-release injectable matrix for feline contraception. Zoo Biol. 2001; 20: 407-421.
82. Loretti AP, da Silva Ilha MR, Ordás J, de las Mulas JM. Clinical, pathological and immunohistochemical study of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of depot medroxyprogesterone acetate. J Feline Med Surg. 2005; 7: 43-52.
83. MacLachlan NJ. Ovarian disorders in domestic animals. Environ Health Perspect. 1987; 73: 27-33.
84. Maggi R. Physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH): Beyond the control of reproductive functions. MOJ Anat Physiol. 2016; 2: 00063.
85. Massei G, Cowan D, Eckery D, Mauldin R, Gomm M, Rochaix P, Hill F, Pinkham R, Miller LA. Effect of vaccination with a novel GnRH-based immunocontraceptive on immune responses and fertility in rats. Heliyon. 2020; 6: e03781.
86. Massei G, Cowan DP, Coats J, Bellamy F, Quay R, Pietravallo S, Brash M, Miller LA. Long-term effects of immunocontraception on wild boar fertility, physiology and behaviour. Wildl Res. 2012; 39: 378-385.
87. Massei G, Cowan DP, Coats J, Gladwell F, Lane JE, Miller LA. Effect of the GnRH vaccine GonaCon on the fertility, physiology and behaviour of wild boar. Wildl Res. 2008; 35: 540-547.
88. Massei G, Koon K-K, Benton S, Brown R, Gomm M, Orahod DS, Pietravallo S, Eckery DC. Immunocontraception for managing feral cattle in Hong Kong. PLoS One. 2015; 10: e0121598.

89. Michel C. Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. Lab Anim. 1993; 27: 278-280.
90. Mitjana O, Bonastre C, Tejedor MT, Garza L, Latorre MÁ, Moreno B, Falceto MV. Immuno-castration of female and male pigs with anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine: Morphometric, histopathological and functional studies of the reproductive system. Anim Reprod Sci. 2020; 221: 106599.
91. Moresco A, Penfold LM, Jankowski G, McCain S, Crook E, Faliano A, Crane J, Wack RF, Goodnight A, Han S. Reproductive suppression of giraffe (*Giraffa camelopardalis*) under managed care using a GnRH immunological product. Zoo Biol. 2022; 41: 65-73.
92. Muphung W, Rungsipipat A, Chatdarong K. Effects of the anti-progestin aglepristone on the uterine tissue of cats administered medroxyprogesterone acetate. Reprod Domest Anim. 2009; 44: 204-207.
93. Murakoshi M, Tagawa M, Ikeda R, Hoshino T, Suzuki M, Nakayama T. The effect of subcutaneous implantation of chlormadinone acetate for preventing estrus in queens. J Toxicol Pathol. 1996; 9: 185-190.
94. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C, National Academies Press, 2011.
95. Nequinio M, Romagnoli S, Beccaglia M, Trovò C, Banzato T, Mollo A, Milani C. Clinical use of melatonin implants to control reproduction in breeding queens. Proceedings of the 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction ISCFR. 2016. Paris, France.

96. Nolan MB, Bertschinger HJ, Roth R, Crampton M, Martins IS, Fosgate GT, Stout TA, Schulman ML. Ovarian function following immunocontraceptive vaccination of mares using native porcine and recombinant zona pellucida vaccines formulated with a non-Freund's adjuvant and anti-GnRH vaccines. Theriogenology. 2018; 120: 111-116.
97. Novak S, Yakobson B, Sorek S, Morgan L, Tal S, Nivy R, King R, Jaebker L, Eckery DC, Raz T. Short term safety, immunogenicity, and reproductive effects of combined vaccination with anti-GnRH (Gonacon) and rabies vaccines in female feral cats. Front Vet Sci. 2021; 8: 650291.
98. Okon E, Livni N, Koch Y. Immunization against gonadotrophin-releasing hormone: Histopathological and hormonal changes in the female rat. Br J Exp Pathol. 1980; 61: 579-589.
99. Padula AM. GnRH analogues—agonists and antagonists. Anim Reprod Sci. 2005; 88: 115-126.
100. Pelican KM, Brown JL, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG. Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. Gen Comp Endocrinol. 2005; 144: 110-121.
101. Pelican KM, Wildt DE, Ottinger MA, Howard J. Priming with progestin, but not GnRH antagonist, induces a consistent endocrine response to exogenous gonadotropins in induced and spontaneously ovulating cats. Domest Anim Endocrinol. 2008; 34: 160-175.

102. Pinkham R, Eckery D, Mauldin R, Gomm M, Hill F, Vial F, Massei G. Longevity of an immunocontraceptive vaccine effect on fecundity in rats. Vaccine X. 2022; 10: 100138.
103. Praderio RG, García Mitacek MC, Núñez Favre R, Rearte R, de la Sota RL, Stornelli MA. Uterine endometrial cytology, biopsy, bacteriology, and serum C-reactive protein in clinically healthy diestrus bitches. Theriogenology. 2019; 131: 153-161.
104. Priedkalns J, Leiser R. Female reproductive system. En: Eurell JAC, Frappier BL. Dellmann's textbook of veterinary histology. Ames, Blackwell, 2006, p. 256-278.
105. Quimby JM, Smith ML, Lunn KF. Evaluation of the effects of hospital visit stress on physiologic parameters in the cat. J Feline Med Surg. 2011; 13: 733-737.
106. Richards JS, Liu Z, Shimada M. Ovulation. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, 2015, p. 997-1021.
107. Risso A, Valiente C, Corrada Y, García Romero G, Blanco PG, de la Sota PE, Diaz JD, Gobello C. The GnRH antagonist acyline prevented ovulation, but did not affect ovarian follicular development or gestational corpora lutea in the domestic cat. Theriogenology. 2010; 73: 984-987.
108. Robbins SC, Jelinski MD, Stotish RL. Assessment of the immunological and biological efficacy of two different doses of a recombinant GnRH vaccine in domestic male and female cats (*Felis catus*). J Reprod Immunol. 2004; 64: 107-119.

109. Rodríguez C, Torres R, Drummond H. Eradicating introduced mammals from a forested tropical island. Biol Conserv. 2006; 130: 98-105.
110. Romagnoli S. Progestins to control feline reproduction: Historical abuse of high doses and potentially safe use of low doses. J Feline Med Surg. 2015; 17: 743-752.
111. Rubion S, Driancourt M. Controlled delivery of a GnRH agonist by a silastic implant (Gonazon) results in long-term contraception in queens. Reprod Domest Anim. 2009; 44: 79-82.
112. Samuelson DA. Textbook of veterinary histology. St. Louis, Missouri, Saunders, 2007.
113. Sandam NP, Dhamodhar P, Thimmareddy P. Cloning, expression, purification and contraceptive efficacy studies of a GnRH receptor based recombinant fusion protein. Curr Trends Biotechnol Pharm. 2022; 16: 155-164.
114. Sandam NP, Prakash D, Thimmareddy P. Immunocontraceptive potential of a GnRH receptor-based fusion recombinant protein. J Genet Eng Biotechnol. 2021; 19: 63.
115. Sarchahi AA, Emadi M, Azarpeykan S. Effects of three steroidal compounds on oestrus suppression in queens. Iran J Vet Res. 2008; 9: 144-149.
116. SAS®. SAS and STAT User's Guide, Release 9.1. Cary, NC, USA, SAS Institute Inc., 2003.

117. Sawada T, Tamada H, Inaba T, Mori J. Prevention of estrus in the queen with chlormadinone acetate administered orally. J Vet Med Sci. 1992; 54: 1061-1062.
118. Saxena BB, Clavio A, Singh M, Rathnam P, Bukharovich EY, Reimers TJ, Saxena A, Perkins S. Effect of immunization with bovine luteinizing hormone receptor on ovarian function in cats. Am J Vet Res. 2003; 64: 292-298.
119. Schäfer-Somi S. Effect of melatonin on the reproductive cycle in female cats: a review of clinical experiences and previous studies. J Feline Med Surg. 2017; 19: 5-12.
120. Schaut RG, Brewer MT, Hostetter JM, Mendoza K, Vela-Ramirez JE, Kelly SM, Jackman JK, Dell'Anna G, Howard JM, Narasimhan B, Zhou W, Jones DE. A single dose polyanhydride-based vaccine platform promotes and maintains anti-GnRH antibody titers. Vaccine. 2018; 36: 1016-1023.
121. Schmid R, Studer E, Hirsbrunner G. Brunstunterdrückung mittels Anti-GnRH-Impfung Improvac® in einem Milchviehbestand: Eine prospektive Feldstudie [Oestrus suppression in a dairy herd by means of anti-GnRH vaccination Improvac®: A prospective field study]. Schweiz Arch Tierheilkd. 2020; 162: 93-100.
122. Schulman ML, Botha AE, Muenscher SB, Annandale CH, Guthrie AJ, Bertschinger HJ. Reversibility of the effects of GnRH-vaccination used to suppress reproductive function in mares. Equine Vet J. 2012; 45: 111-113.

123. Schütz J, Rudolph J, Steiner A, Rothenanger E, Hüsler J, Hirsbrunner G. Immunization against gonadotropin-releasing hormone in female beef calves to avoid pregnancy at time of slaughter. Animals. 2021; 11: 2071.
124. Schwarzenberger F, Krawinkel P, Jeserschek S-M, Schauerte N, Geiger C, Balfanz F, Knauf-Witzens T, Sicks F, Martinez Nevado E, Anfray G, Hein A, Kaandorp-Huber C, Marcordes S, Venshøj B. Immunocontraception of male and female giraffes using the GnRH vaccine Improvac<sup>®</sup>. Zoo Biol. 2022; 41: 50-64.
125. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. Pharmacol Rev. 2003; 55: 325-395.
126. Spehar DD, Wolf PJ. Back to school: an updated evaluation of the effectiveness of a long-term trap-neuter-return program on a university's free-roaming cat population. Animals. 2019; 9: 768.
127. Srivastav A, Kass PH, McGill LD, Farver TB, Kent MS. Comparative vaccine-specific and other injectable-specific risks of injection-site sarcomas in cats. J Am Vet Med Assoc. 2012; 241: 595-602.
128. Stewart RA, Pelican KM, Brown JL, Wildt DE, Ottinger MA, Howard JG. Oral progestin induces rapid, reversible suppression of ovarian activity in the cat. Gen Comp Endocrinol. 2010; 166: 409-416.
129. Stornelli M, García M, Praderio R, Coralli F, Nuñez Favre R, Stornelli M. Expresión del factor de crecimiento de endotelios vasculares y su receptor FTL-1 en ovario felino: estudio preliminar. IX Jornada de Difusión de la

Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias Veterinarias. 2021.  
Esperanza, Santa Fe.

130. Stornelli MC, García Mitacek MC. Gestación en la perra y en la gata. En: Stornelli MA, De la Sota RL. Manual de reproducción de animales de producción y compañía. La Plata, Edulp, 2016, p. 122-141.
131. Tamada H, Kawate N, Inaba T, Sawada T. Long-term prevention of estrus in the bitch and queen using chlormadinone acetate. Can Vet J. 2003; 44: 416-417.
132. Toydemir TSF, Kılıçarslan MR, Olgaç V. Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. Theriogenology. 2012; 77: 662-674.
133. Valiente C, Romero GG, Corrada Y, de la Sota PE, Hermo G, Gobello C. Interruption of the canine estrous cycle with a low and a high dose of the GnRH antagonist, acyline. Theriogenology. 2009; 71: 408-411.
134. Vansandt L, Kutzler M, Fischer A, Morris K, Swanson W. Safety and effectiveness of a single and repeat intramuscular injection of a GnRH vaccine (GonaCon™) in adult female domestic cats. Reprod Dom Anim. 2017; 52: 348-353.
135. Vansandt LM. Feline Estrous Cycle. En: Johnson A, Kutzler M. Feline Reproduction. GB, CABI, 2022, p. 11-22.
136. Verstegen JP. Physiology and edocrinology of reproduction in female cats. En: Simpson GM, England GCW, Harvey M. BSAVA Manual of small animal reproduction and neonatology. Cheltenham, British small animal veterinary, 1998, p. 11-16.

137. Vitásek R, Dendisová H. Treatment of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of proligestone. Acta Vet Brno. 2006; 75: 295-297.
138. Watson ED, Pedersen HG, Thomson SRM, Fraser HM. Control of follicular development and luteal function in the mare: Effects of a GnRH antagonist. Theriogenology. 2000; 54: 599-609.
139. Wei S, Gong Z, Dong J, Ouyang X, Xie K, Wei M. Effects of GnRHa active immunity on FSHR expression and uterine development in prepuberty and non cyclic ewes. Iran J Vet Res. 2014; 15: 244-249.
140. Wei S, Gong Z, Wei M. Studies of GnRH-A active immunization effects on LH and FSH secretion and histostructure of the ovary and uterus in rabbits. Agric Sci China. 2011; 10: 1630-1637.
141. Wicks N, Crouch S, Pearl CA. Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. Animal Reproduction Science. 2013; 142: 149-159.
142. Williams ARW, Critchley HOD, Osei J, Ingamells S, Cameron IT, Han C, Chwalisz K. The effects of the selective progesterone receptor modulator asoprisnil on the morphology of uterine tissues after 3 months treatment in patients with symptomatic uterine leiomyomata. Hum Reprod. 2007; 22: 1696-1704.
143. Yamaguchi M, Yoshihara K, Suda K, Nakaoka H, Yachida N, Ueda H, Sugino K, Mori Y, Yamawaki K, Tamura R, Ishiguro T, Motoyama T, Watanabe Y, Okuda S, Tainaka K, Enomoto T. Three-dimensional

understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium. [iScience](#). 2021; 24: 102258.

## **BIOGRAFÍA PERSONAL**

El Médico Veterinario Zootecnista Washington Fernando Carrasco Sangache nació en San Miguel de Bolívar – Ecuador el 13 de septiembre de 1990. Realizó sus estudios primarios en la escuela 24 de mayo y sus estudios secundarios en el colegio Ángel Polibio Chaves de la ciudad de San Miguel de Bolívar. En el 2007 ingresó a la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Estatal de Bolívar en la ciudad de Guaranda – Ecuador y obtuvo su título en noviembre del 2012.

En el 2013 ingresó a la maestría en clínica y cirugía canina en la Universidad Agraria del Ecuador obteniendo el título de Magister en clínica y cirugía canina en diciembre del 2015.

En el año 2014 ingresó como docente en la carrera de Medicina veterinaria y zootecnia de la Universidad Estatal del Bolívar en donde desempeña sus labores hasta la actualidad.

En el año 2018 como parte del plan de formación doctoral de la Universidad Estatal de Bolívar obtuvo una beca para iniciar su formación doctoral en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Comenzando su Tesis Doctoral en esta facultad bajo la dirección de la Dra. María Alejandra Stornelli y la codirección de la Dra. María Carla García Mitacek en la Cátedra de Reproducción Animal. Una vez finalizada la tesis, continuará con su labor de docencia e investigación en la Universidad Estatal de Bolívar.